

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|---|-----------|---|
| (51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12N 9/20, A61K 38/46 | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 00/44887 (43) Date de publication internationale: 3 août 2000 (03.08.00) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00109 (22) Date de dépôt international: 19 janvier 2000 (19.01.00) (30) Données relatives à la priorité: 99/00879 27 janvier 1999 (27.01.99) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MAILLÈRE, Bernard [FR/FR]; 1, promenade Vénétia, F-78000 Versailles (FR). POUVELLE, Sandra [FR/FR]; 17, rue Des Maraichers, F-91620 Nozay (FR). TEXIER, Catherine [FR/FR]; 2, rue André Maginot, F-91400 Orsay (FR). MENEZ, André [FR/FR]; 102, avenue Claude Nicolas Ledoux, F-78114 Magny-les-hameaux (FR). (74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR). | | (81) Etats désignés: CA, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i> |

(54) Title: PEPTIDES AND PROTEINS FOR DESENSITIZING SUBJECTS ALLERGIC TO BEE VENOM AND COMPOSITIONS CONTAINING SAME

(54) Titre: PEPTIDES ET PROTEINES APTES A DESENSIBILISER LES SUJETS ALLERGIQUES AU VENIN D'ABEILLE ET COMPOSITIONS LES CONTENANT

(57) Abstract

The invention concerns peptides and proteins for desensitizing specifically the vast majority of subjects allergic to bee venom and compositions containing said peptides or proteins. The peptides are selected in the group consisting of: the fragment (1) corresponding to positions P85-97 of the major bee venom allergen, the fragment (2) corresponding to positions P81-93 of the major bee venom allergen, the fragment (3) corresponding to positions P94-106 of the major bee venom allergen, the fragment (4) corresponding to positions P76-88 of the major bee venom allergen, the fragment (5) corresponding to positions P77-94 of the major bee venom allergen, and the fragment (6) corresponding to positions P122-134 of the major bee venom allergen, fragments (1) and (2) forming group (I); fragment (3) forming group (II); fragments (4) and (4) forming group (III) and fragment (6) forming group IV and the mutated fragments of said fragments (1) to (6) which have a binding activity with MHC class (II) molecules identical or higher than those of said fragments (1) to (6). The invention also concerns compositions containing said peptides or proteins.

(57) Abrégé

Peptides et protéines aptes à désensibiliser, de manière spécifique, la grande majorité des sujets allergiques au venin d'abeille, ainsi que compositions contenant lesdits peptides ou protéines. Les peptides sont sélectionnés dans le groupe constitué par: le fragment (1) correspondant aux positions P85-97 de l'allergène majeur du venin d'abeille, le fragment (2) correspondant aux positions P81-93 de l'allergène majeur du venin d'abeille, le fragment (3) correspondant aux positions P94-106 de l'allergène majeur du venin d'abeille, le fragment (4) correspondant aux positions P76-88 de l'allergène majeur du venin d'abeille, le fragment (5) correspondant aux positions P77-94 de l'allergène majeur du venin d'abeille, et le fragment (6) correspondant aux positions P122-134 de l'allergène majeur du venin d'abeille, les fragments (1) et (2) formant le groupe (I); le fragment (3) formant le groupe (II); les fragments (4) et (5) formant le groupe (III) et le fragment (6) formant le groupe (IV) et les fragments mutés desdits fragments (1) à (6) qui présentent une activité de liaison aux molécules du CMH de classe (II) identiques ou supérieures à celles desdits fragments (1) à (6). Compositions contenant lesdits peptides ou protéines.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | | | |
|----|---------------------------|----|---|----|--|----|-----------------------|
| AL | Albanie | ES | Espagne | LS | Lesotho | SI | Slovénie |
| AM | Arménie | FI | Finlande | LT | Lituanie | SK | Slovaquie |
| AT | Autriche | FR | France | LU | Luxembourg | SN | Sénégal |
| AU | Australie | GA | Gabon | LV | Lettonie | SZ | Swaziland |
| AZ | Azerbaïdjan | GB | Royaume-Uni | MC | Monaco | TD | Tchad |
| BA | Bosnie-Herzégovine | GE | Géorgie | MD | République de Moldova | TG | Togo |
| BB | Barbade | GH | Ghana | MG | Madagascar | TJ | Tadjikistan |
| BE | Belgique | GN | Guinée | MK | Ex-République yougoslave de Macédoine | TM | Turkménistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Grèce | ML | Mali | TR | Turquie |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | MN | Mongolie | TT | Trinité-et-Tobago |
| BJ | Bénin | IE | Irlande | MR | Mauritanie | UA | Ukraine |
| BR | Brésil | IL | Israël | MW | Malawi | UG | Ouganda |
| BY | Bélarus | IS | Islande | MX | Mexique | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada | IT | Italie | NE | Niger | UZ | Ouzbékistan |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon | NL | Pays-Bas | VN | Viet Nam |
| CG | Congo | KE | Kenya | NO | Norvège | YU | Yougoslavie |
| CH | Suisse | KG | Kirghizistan | NZ | Nouvelle-Zélande | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | République populaire démocratique de Corée | PL | Pologne | | |
| CM | Cameroun | KR | République de Corée | PT | Portugal | | |
| CN | Chine | KZ | Kazakstan | RO | Roumanie | | |
| CU | Cuba | LC | Sainte-Lucie | RU | Fédération de Russie | | |
| CZ | République tchèque | LI | Liechtenstein | SD | Soudan | | |
| DE | Allemagne | LK | Sri Lanka | SE | Suède | | |
| DK | Danemark | LR | Libéria | SG | Singapour | | |
| EE | Estonie | | | | | | |

PEPTIDES ET PROTEINES APTES A DESENSIBILISER LES SUJETS ALLERGIQUES AU VENIN D'ABEILLE ET COMPOSITIONS LES CONTENANT.

La présente invention est relative à des peptides et à des protéines
5 aptes à désensibiliser, de manière spécifique, la grande majorité des sujets allergiques au venin d'abeille, ainsi qu'à des compositions contenant lesdits peptides ou protéines.

L'allergie immédiate aux hyménoptères (abeille, guêpe, frelon) touche 15 à 20 % de la population, si l'on tient compte des tests cutanés à lecture immédiate (*prick tests*), mais seulement 0,1 à 0,5 % de la population est exposé à un
10 accident de type anaphylactique (1, 2). Cette allergie se caractérise par des manifestations variables allant du gonflement local aux réactions systémiques comme l'urticaire, l'angiodème ou le choc anaphylactique. Compte tenu de la soudaineté des piqûres, la désensibilisation (immunothérapie spécifique ou ITS) par les venins constitue le traitement de choix de cette allergie mais n'est pas sans danger. En effet, 13 % des
15 patients désensibilisés par le venin d'abeille et 5 % dans le cas du venin de guêpe sont victimes d'effets secondaires (3). La recherche d'une ITS mieux tolérée et aussi efficace est donc nécessaire, en particulier pour le venin d'abeille.

La rapidité des réactions observées chez les patients allergiques au venin d'abeille est caractéristique d'une allergie de type immédiate, qui est médiée par
20 des IgE spécifiques des constituants du venin. Le mécanisme complexe de ces réactions est résumé ci-après.

Les IgE apparaissent progressivement sous l'action répétée des piqûres et avant que le moindre symptôme ne soit apparent. Bien que le venin de l'abeille comporte de nombreux peptides et protéines, tous les composants ne semblent
25 par allergéniques (4). La mélittine par exemple n'induit des IgE que chez 30 % des patients, alors que la proportion s'élève à plus de 90 % pour la phospholipase A2 (PLA2) qui est, de fait, considérée comme l'allergène majeur (API m1) (4, 5). La séquence protéique de la phospholipase A2 du venin d'abeille (API m1) est illustrée à la figure 1 ; cette séquence est déduite de celle de l'ADNc complémentaire (36).

30 Les IgE possèdent la propriété de se fixer par leur fragment Fc à des récepteurs situés sur les mastocytes tissulaires et les basophiles du sang. Lorsque

l'allergène se complexe aux IgE spécifiques fixées à la membrane des basophiles ou des mastocytes, il provoque la dégranulation de ces cellules et la libération de molécules qui sont responsables des principales manifestations observées lors de l'accident allergique. Les IgE ne sont cependant pas seules responsables de l'allergie car bien que le taux d'IgE soit un indicateur de la maladie, il n'a aucune valeur diagnostique de l'état des patients. Il n'est pas rare que des patients aient des taux élevés d'IgE sans présenter de symptômes. L'apparition des IgE chez les patients allergiques résulte de la production de cytokines de type TH2 telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 et est inhibée par la synthèse d'IFN- γ (6).

Ce sont principalement les lymphocytes T CD4⁺ qui produisent ces cytokines. On retrouve effectivement chez les patients allergiques des cellules T spécifiques qui sécrètent plus d'IL-4 que d'IFN- γ , alors que les cellules T isolées chez des sujets non allergiques produisent plus d'IFN- γ que d'IL-4.

Les lymphocytes T CD4⁺ de type TH2 et spécifiques des composants du venin participent donc activement à l'apparition et au maintien de l'allergie.

Pour protéger les sujets allergiques au venin d'abeille, il a été proposé, depuis longtemps, de désensibiliser les sujets allergiques par immunothérapie spécifique (ou ITS). Les mécanismes immunologiques de l'ITS, responsables de l'amélioration de l'état du patient restent mal compris. L'induction d'IgG spécifiques et de sous-classe-IgG4 (7) ainsi que la génération de cellules T CD8⁺ suppressives (8) ont initialement été proposées pour rendre compte de l'efficacité du traitement. Mais plus récemment, il a été observé qu'au cours de la désensibilisation au venin d'abeille, la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de l'allergène décroît alors que la sécrétion de l'IL-4 et de l'IL-5 diminue (9, 10) ou est détournée vers la production d'IFN- γ (11). Des résultats très similaires ont été également obtenus avec des allergènes de pollens (12). Ces observations semblent indiquer que l'amélioration de l'état du patient résulte d'une tolérance périphérique ou d'une dérive vers un profil de type TH1 des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de l'allergène. Elles sont de plus en accord avec des expériences effectuées chez l'animal. Il a été en effet montré pour plusieurs

antigènes que dans des conditions d'injection proches de celles utilisées pour désensibiliser (telles que l'injection sous-cutanée) l'anergie des lymphocytes T est induite alors qu'une forte réponse est observée pour les mêmes antigènes lorsqu'ils sont injectés en présence d'adjuvant (13, 14). L'ensemble de ces expériences permet de considérer les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques du venin d'abeille comme les cellules cibles de l'immunothérapie.

Les lymphocytes T CD4⁺ possèdent un récepteur T réarrangé qui leur permet de reconnaître sélectivement les fragments peptidiques issus de la dégradation de l'antigène par les cellules présentatrices et présentés par les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH II) (15). Les déterminants que portent ces fragments peptidiques et que reconnaissent effectivement les lymphocytes T sont appelés épitopes T.

Lors de la désensibilisation, ce sont ces déterminants qui sont reconnus par les lymphocytes T et qui donc constituent les éléments de base pour l'élaboration de molécules alternatives d'immunothérapie spécifique.

Il a été en effet observé *in vivo* chez la souris pour les allergènes Fel d1 (poil de chat), Der p1 (acarien : *Dermatophagoïdes pterissimus*) et Bet v1 (pollen de bouleau) que l'administration par voie nasale, orale ou sous-cutanée de peptides porteurs d'épitopes T de ces allergènes inhibe l'activation des lymphocytes T spécifiques (16-18) et module la réaction allergique (16, 18).

Idéalement, les molécules de désensibilisation doivent posséder tous les épitopes de l'allergène et être dépourvues de réactivité vis-à-vis des IgE, de manière à éviter les risques d'accidents.

Plusieurs types de molécules sont d'ores et déjà à l'étude y compris dans le cadre de l'allergie au venin d'abeille et sont constitués soit de fragments peptidiques, soit de protéines modifiées.

. Fragments peptidiques

Par une démarche empirique, l'utilisation de fragments peptidiques (19) pour désensibiliser les patients allergiques a été à plusieurs reprises proposée comme alternative à la désensibilisation spécifique conventionnelle y compris pour

l'allergie au venin d'abeille (20, 21).

Ces fragments ne possèdent généralement plus de réactivité vis-à-vis des IgE, mais peuvent également avoir perdu leur capacité à être reconnus par les lymphocytes T.

5 Plus récemment, des fragments peptidiques d'allergène ont été choisis sur la base de leur capacité à stimuler des lymphocytes T de patients allergiques (22).

Dans le cas de l'allergène majeur du venin d'abeille (API m1), les fragments 50-69 et 83-97 ont été décrits comme étant actifs lors d'une étude comprenant un seul patient (23).

Dans une étude comprenant quarante patients (24), ce sont les fragments 45-62 et 81-92 et 113-124 qui se sont révélés être actifs. Ces trois fragments ne sont épitopes T que pour 25 à 45 % des patients et les auteurs n'excluent pas l'existence d'autres épitopes (24, 25). Ces trois peptides sont en cours d'essai clinique et
15 semblent donner des résultats encourageants (22). Muller et al. (22) les ont utilisés pour désensibiliser cinq patients allergiques dont les lymphocytes T prolifèrent en présence de ces peptides. Aucun effet systémique grave n'a été observé et les patients sont devenus tolérants aux piqûres d'abeille. Ceci démontre l'intérêt de l'utilisation de peptides pour désensibiliser, mais ne permet pas d'étendre l'utilisation de ces peptides
20 à d'autres patients.

Un autre essai utilisant des peptides a été mis en place pour l'allergène du chat (Fel d1) (26). Plusieurs demandes relatives à des peptides du *ragweed* (WO 93/21321 ; WO 96/13589), du pollen du cèdre japonais (WO 93/01213 ; WO 94/01560) et du pollen de ray-grass (WO 94/21675 ; WO 94/16068) ont été déposées.

25 Tous les peptides décrits dans ces demandes ont été choisis sur la base de la stimulation de lymphocytes T d'un échantillon de patients allergiques.

La démarche suivie par ces différents auteurs (23, 24 et 30) est basée sur des tests cellulaires et non sur des tests de liaison. Les résultats observés montrent que les peptides actifs varient selon les patients. Dans ces trois dernières études, les
30 peptides contenant la zone 80-90 sont ceux qui sont le plus souvent épitope T. Ils montrent également que les lymphocytes de plusieurs patients sont stimulés par des

peptides contenant la partie C-terminale de API m1.

Par exemple, Kämmerer et al. (30) propose, selon le même principe du test de stimulation, d'utiliser de longs fragments d'API m1, en particulier le fragment 90-134. Toutefois, ces fragments sont spécifiques de certains patients et ne sont pas adaptés à un ensemble significatif de patients, du fait que leur sélection ne tient pas compte du type HLA des patients.

Les tests de stimulation permettent en effet de sélectionner des peptides adaptés à la désensibilisation d'un patient donné (22), mais ne permettent pas d'étendre l'utilisation de ces peptides à d'autres patients que ceux pour lesquels ils ont été élaborés.

. Protéines modifiées

Une autre alternative à l'utilisation d'allergènes natifs est celle d'allergènes modifiés de telle sorte qu'il n'y ait plus de réactivité vis-à-vis des IgE spécifiques de l'allergène, tout en conservant leur réactivité vis-à-vis des lymphocytes T. Les IgE étant principalement dirigées contre des épitopes conformationnels, la perte de réactivité peut être facilement obtenue en détruisant la structure tridimensionnelle de l'allergène ce qui ne modifie pas les épitopes T. C'est ce qui a été fait pour des mutants de Der f2 (27) et Der p2 (28) dans lesquels des ponts disulfures ont été rompus. Une autre façon de procéder est d'introduire dans l'allergène des mutations ponctuelles qui affectent la reconnaissance des IgE sans modifier la structure tridimensionnelle (29). Le faible nombre de mutations introduites est censé ne pas modifier les épitopes T.

Les différences importantes observées entre études traduisent la variabilité interindividuelle des épitopes T et rendent évidemment difficile le choix des molécules de désensibilisation. De plus, ces études qui n'utilisent qu'un échantillon de patients allergiques ne permettent pas d'assurer que tous les épitopes T sont conservés dans la molécule de désensibilisation.

C'est pourquoi les Inventeurs se sont donnés pour but de pourvoir à un ensemble de peptides aptes à désensibiliser la grande majorité des sujets allergiques au venin d'abeille.

Un tel ensemble de peptides a pour propriété d'être efficace chez un

grand nombre de sujets, alors que les peptides de l'Art antérieur sont actifs chez un sujet allergique mais peuvent être totalement inefficaces pour un autre sujet parce que ce dernier ne reconnaît pas l'allergène par les mêmes déterminants.

Pour ce faire, les Inventeurs ont défini une relation entre les
5 séquences peptidiques de l'allergène majeur du venin d'abeille (API m1) et des molécules du CMH de classe II, aussi bien les allèles du gène HLA-DRB1 (1^{er} gène), que les allèles des gènes DRB3, DRB4 et DRB5 (2^{ème} gène), prépondérants dans les populations caucasiennes. Cette relation permet, de manière inattendue, de définir des molécules de désensibilisation et de traitement préventif de l'allergie au venin d'abeille
10 qui tiennent compte du polymorphisme du CMH de classe II, notamment des molécules HLA-DR, et qui de par leur grande spécificité, induisent une meilleure désensibilisation qui se traduit par un risque significativement diminué des accidents (chocs) en cours de désensibilisation. Ceci représente un atout supplémentaire pour l'utilisation de tels peptides à titre préventif.

15 Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (HLA II chez l'homme) sont des hétérodimères exprimés sur les cellules présentatrices et présentent aux lymphocytes T CD4⁺ les épitopes T des antigènes. Ces molécules sont capables de lier un répertoire important de peptides ayant des séquences très différentes, ce qui leur permet de présenter aux cellules T plusieurs
20 peptides par antigène.

Il existe quatre types différents de molécules du CMH II par individu (2 HLA-DR, 1 HLA-DQ et 1 HLA-DP). La molécule HLA-DR dont la chaîne β est codée par le gène DRB1 (1^{er} gène) est la plus exprimée. On répertorie, actuellement plus de 200 allèles différents pour DRB1, qui définissent différents antigènes ou
25 types, comme résumé dans le Tableau I ci-après.

Tableau I : Molécules exprimées par différents allèles HLA-DRB1

| Antigène | Allèle | Alias |
|----------|-----------|--------|
| DR1 | DRB1*0101 | DR1 |
| DR2 | DRB1*1501 | DR2w2b |
| DR3 | DRB1*0301 | DR3w17 |
| DR4 | DRB1*0401 | DR4w4 |
| | DRB1*0405 | DR4w15 |
| DR7 | DRB1*0701 | DR7 |
| DR8 | DRB1*0802 | DR8w2 |
| DR9 | DRB1*0901 | DR9 |
| DR11 | DRB1*1101 | DR5w11 |
| DR12 | DRB1*1201 | DR5w12 |
| DR13 | DRB1*1301 | |
| | DRB1*1302 | DR6w19 |

Chaque allèle possède ses propres propriétés de liaison. Il lie donc un répertoire de peptides qui lui est propre et qui diffère de celui d'un autre allèle, même sur un même antigène. La spécificité large des molécules HLA II et l'existence de plusieurs isoformes et d'un polymorphisme important font que de nombreux fragments différents de l'antigène peuvent être présentés aux lymphocytes T.

Les fréquences de chaque allèle (1^{er} gène) ne sont pas identiques et varient d'une population à l'autre (35) :

10 - l'allèle DRB1*1304 représente à lui seul 25,4 % des allèles de la population sénégalaise contre 0 % en Allemagne et au Japon.

- l'allèle DRB1*0301 est observé avec une fréquence de 10 % chez les sénégalais et les allemands mais seulement à 0,4 % chez les japonais.

- en France, seuls sept allèles dépassent les 5 %. Il s'agit des allèles
15 DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1301 et DRB1*1501, comme illustré au Tableau II, ci-après.

Tableau II : Fréquence des allèles HLA-DR dans plusieurs populations caucasiennes

| | | FRA | DAN | GER | ITA | ROU | SPA | US | CAN |
|----|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 5 | DRB1*0101 | 9,3 | 13,0 | 6,7 | 6,5 | 7,6 | 6,6 | 7,3 | 5,6 |
| | DRB1*0301 | 10,9 | 10,2 | 9,4 | 10,5 | 11,4 | 6,7 | 9,5 | 12,3 |
| | DRB1*0401 | 5,6 | 17,6 | 8,1 | 2,3 | 4,2 | 5,6 | 6,7 | 9,5 |
| | DRB1*0701 | 14,0 | 14,8 | 12,3 | 12,5 | 8,3 | 18,9 | 14,4 | 9,4 |
| 10 | DRB1*1101 | 9,2 | 0,9 | 9,2 | 12,4 | 7,3 | 1,0 | 4,4 | 2,6 |
| | DRB1*1301 | 6,0 | 8,3 | 4,5 | 4,8 | 4,4 | 4,5 | 5,1 | 4,7 |
| | DRB1*1501 | 8,0 | 17,6 | 7,8 | 5,6 | 6,2 | 9,4 | 10,3 | 10,4 |
| | Total | 63 | 82 | 58 | 55 | 49 | 53 | 58 | 55 |

15 Ils représentent à eux seuls 63 % de la population française. Ces mêmes allèles sont aussi les plus abondants dans les autres populations caucasiennes. Leurs fréquences varient de 53 % (en Espagne) à 82 % (au Danemark). Pour les États-Unis et le Canada, ils représentent respectivement 58 et 55 % de la population. Ils représentent donc à eux seuls 53 à 82 % des allèles des populations caucasiennes et
20 font partie des différentes spécificités de séries HLA-DR.

Le 2^{ème} gène code pour les molécules HLA-DRB3, -DRB4 et DRB5 qui sont des molécules HLA-DR dont la chaîne β n'est pas codée par le gène DRB1. Bien que moins connues que les molécules issues du 1^{er} gène, ces molécules HLA sont fonctionnelles et sont capables de présenter des peptides aux lymphocytes T (56-59).
25 Leur principal intérêt pour l'immunothérapie est que des allèles comme DRB3*0101 (9,2 %), DRB4*0101 (28,4 %) et DRB5*0101 (7,9 %) sont très fréquents dans la population caucasienne. Ils couvrent à eux seuls 45 % de la fréquence génique. Ils sont systématiquement associés à une autre molécule HLA-DR et peuvent donc compléter sa spécificité. Il existe un fort déséquilibre de liaison entre le 1^{er} et le 2^{ème} gène, c'est-à-
30 dire qu'un 2^{ème} gène est très souvent associé à des allèles particuliers du 1^{er} gène. L'ensemble des gènes et pseudo gène DR présents sur un même chromosome consti-

tue un haplotype DR (figure 5). Chaque haplotype est défini par la deuxième molécule DR qui le caractérise.

Le rôle des molécules de CMH II dans l'allergie a historiquement été initié par la découverte d'association entre le taux d'IgE contre un allergène donné et certains allèles. Ces associations concernent de nombreux allergènes de faible masse moléculaire comme Amb a5, Lol p3 et Amb a6 (31) qui sont les allergènes pour lesquels les risques relatifs sont les plus importants. Ces associations ne sont pas systématiques ou correspondent à des risques relatifs très faibles.

Dans le cas du venin d'abeille, il a été montré que l'allèle HLA-DR7 est plus fréquent chez les patients allergiques que dans la population témoin (32) alors que l'allèle HLA-DR4 est au contraire sous-représenté chez les allergiques au venin d'abeille (33).

Le contrôle de la réponse en IgE (et en IgG) par les molécules de classe II est encore plus clair chez la souris (34). Les souris H-2^d et H-2^k sont en effet bonnes répondeuses alors que les souris H-2^b répondent peu ou pas à cet allergène.

La présente invention a pour objet des peptides aptes à désensibiliser un sujet allergique au venin d'abeille, caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés dans le groupe constitué par :

- le fragment (1) correspondant aux positions P85-97 de l'allergène majeur du venin d'abeille,
- le fragment (2) correspondant aux positions P 81-93 de l'allergène majeur du venin d'abeille,
- le fragment (3) correspondant aux positions P 94-106 de l'allergène majeur du venin d'abeille,
- le fragment (4) correspondant aux positions P76-88 de l'allergène majeur du venin d'abeille,
- le fragment (5) correspondant aux positions P77-94 de l'allergène majeur du venin d'abeille,
- le fragment (6) correspondant aux positions P122-134 de l'allergène majeur du venin d'abeille, et

- les fragments mutés desdits fragments (1) à (6) qui présentent une activité de liaison aux molécules du CMH de classe II identiques ou supérieures à celles desdits fragments (1) à (6).

Les fragments (1) et (2) forment le groupe I ; le fragment (3) forme le groupe II ; les fragments (4) et (5) forment le groupe III et le fragment (6) forme le groupe IV.

De tels peptides comprennent des déterminants ou épitopes T qui interagissent avec une ou plusieurs molécules HLA-DR issus des gènes DRB1 ou autres DRB (DRB3, DRB4 et DRB5).

La présente invention englobe également les peptides tels que définis ci-dessus, polymérisés.

Le site de liaison des peptides aux molécules de classe II est situé entre les hélices α des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ et forme un sillon ouvert aux deux extrémités. Cette ouverture permet la liaison de peptides ayant des tailles variables, en général de 13 à 25 acides aminés. L'ancrage des peptides aux molécules du CMH II se fait grâce à des liaisons hydrogène entre le squelette du peptide et des acides aminés du sillon et grâce à des résidus qu'accommodent des poches de spécificité. Cinq poches, dénommées P1, P4, P6, P7 et P9, correspondent à l'acide aminé du peptide qu'elle accommode, la première position étant celle qui est dans la première poche, accueillent des acides aminés du peptide et sont composées de résidus conservés ou polymorphes. Les résidus polymorphes sont responsables des différences de spécificité entre molécules de CMH II. Comme le site de liaison est ouvert, deux peptides liant une molécule de CMH II peuvent le faire selon différents modes, c'est-à-dire en utilisant des résidus d'ancrage différents dans leur séquence.

Des peptides P81-93 et P85-97 mutés au niveau d'au moins un résidu correspondent à l'une des poches P1, P4, P6, P7 et P9 sont en particulier incluent dans l'invention.

De manière à pouvoir introduire des résidus qui préservent ou augmentent l'activité de liaison, les modes d'interaction des peptides P81-93 et P85-97 vis-à-vis des molécules HLA-DR capables de les lier ont été étudiés. L'approche choisie a été d'introduire à chaque position une alanine de manière à évaluer le rôle de

la chaîne latérale dans l'interaction ou une lysine qui est un acide aminé basique et encombrant. S'il y a lieu, une combinaison de mutations a été introduite. A titre d'exemple, on observe sur la figure 6 une baisse d'activité provoquée par les substitutions de la phénylalanine 88 par une lysine ou une alanine. D'autres baisses d'activité
5 sont observées à des positions situées à 3, 5 et 8 acides aminés de la phénylalanine 88. Ce profil d'activité correspond à un mode de liaison où les positions F88, I91, T93 et Y96 sont accommodées par respectivement les poches P1, P4, P6 et P9 des molécules HLA-DRB3*0101, HLA-DRB5*0101, HLA-DRB1*1301 et HLA-DRB1*0701. Ce mode d'association a été confirmé par modélisation moléculaire pour les complexes :
10 P85-97/DRB3*0101, P85-97/DRB5*0101 et P81-93/DRB4*0101. L'ensemble des résultats est donné figure 7. On constate que sur la séquence 81-97, il existe au moins six modes de liaison aux molécules HLA-DR. On remarque également que le mode I est commun à huit molécules alors que les modes V et VI sont propres à une seule molécule.

15 Le fait que l'on puisse très exactement savoir comment le peptide se positionne sur chaque molécule HLA-DR permet de proposer des modifications de séquence :

* sur les positions P1, P4, P6, P7 et P9, il est possible d'introduire des modifications qui sont compatibles avec les spécificités connues des molécules
20 HLA (61). Il est par exemple probable que la tyrosine 87 puisse être changée par une phénylalanine sans aucune perte d'activité. En revanche, la substitution de la phénylalanine 88 par une tyrosine ne devrait pas causer de perte d'activité pour, par exemple, les molécules DRB1*0101 et DRB1*0401 mais devrait diminuer l'activité du peptide pour des molécules comme DRB1*0301 ou DRB3*0101.

25 * il est également possible d'augmenter l'affinité du peptide en modifiant de manière optimale les résidus P1, P4, P6, P7 et P9. C'est ce qui a été fait pour les résidus 89 et 84. Le résidu 89 peut être avantageusement modifié en leucine ou en thréonine (Tableau IX). En particulier, la substitution par la leucine augmente l'affinité du peptide 85-97 d'un facteur 10 et 12 pour respectivement les molécules
30 DRB3*0101 et DRB1*0301. Dans le cas de DRB1*0301, cette augmentation s'explique par le fait que l'asparagine N89 en position P1 n'est pas optimale pour cette

molécule contrairement à la leucine (61). De même, la substitution de la glycine 84 par une alanine augmente l'affinité d'un facteur 5 pour DRB1*1501. Cette augmentation est en accord avec le positionnement de la glycine 84 en P1 et devrait être encore plus élevée si on introduit un résidu hydrophobe tel que la leucine ou l'isoleucine. En revanche, la substitution de l'acide aspartique D92 systématiquement diminue l'affinité pour DRB1*0301. Cette baisse d'activité est conforme au rôle d'ancrage de l'acide aspartique en P4 pour cette molécule.

* sur les positions, P-2, P-1, P2, P3, P5, P8, P10 et P11 des modifications peuvent être introduites sans crainte de provoquer des pertes majeures d'affinité.

**Tableau IX : Activités relatives des peptides modifiés
par rapport au peptide P85-97A.**

| | Peptides | | | | |
|-----------|----------|------|------|------|------|
| | N89L | N89T | D92N | D92L | D92T |
| DRB1*0101 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| DRB1*0301 | 12 | 7 | -57 | -29 | -12 |
| DRB1*0401 | 4 | 2 | 3 | -2 | 4 |
| DRB1*0701 | 4 | 3 | 3 | 12 | 9 |
| DRB1*1101 | 8 | 2 | 8 | 7 | 13 |
| DRB1*1301 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| DRB3*0101 | 10 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| DRB5*0101 | 1 | -1 | 2 | 2 | 2 |

Les peptides N89L, N89T, D92N, D92L, D92T sont des analogues du peptide P85-97A. La première lettre correspond à l'acide aminé d'origine, le numéro à sa position dans la séquence d'Api m1 et la deuxième lettre à la modification introduite. Les données correspondent aux ratios entre les IC₅₀ des analogues et celle du peptide de référence P85-97A. Un signe - signifie une perte d'activité et l'absence de signe signifie une augmentation d'activité.

Le peptide P85-97A possède une alanine en position 95 en remplacement de la cystéine. Cette substitution ne provoque pas de modification de l'activité quelle que soit la molécule HLA-DR.

Conformément à l'invention, au moins l'une des positions P1, P4,

P6 et P9 des fragments (1), en référence à la figure 7 est mutée.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, lesdits fragments (1) comportent l'un des acides aminés mutés suivants : N89L, N89T, C95A, G84L, G84I.

5 Egalement conformément à l'invention, au moins l'une des positions P-2, P-1, P2, P3, P5, P8, P10 et P11 des fragments (1), en référence à la figure 7, est mutée.

La présente invention a également pour objet des compositions désensibilisantes pour les allergies au venin d'abeille, caractérisées en ce qu'elles
10 comprennent :

- au moins un peptide sélectionné dans le **groupe A** constitué par :

- * les peptides de groupe I, tel que défini ci-dessus et

- * les peptides constitués par des fragments d'au moins 13 acides aminés qui sont inclus dans ou comprennent le fragment correspondant aux positions
15 P81-97 de l'allergène majeur du venin d'abeille (API m1), qui se lie au moins aux molécules HLA-DR codées par les allèles HLA DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1301 et DRB1*1501 (molécules DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13 et DR2), avec une activité de liaison < 1000 nM et

20 - au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

De telles compositions particulièrement bien adaptées au patient peuvent avantageusement être utilisées à titre préventif ou à titre curatif.

Selon un mode de réalisation avantageux desdites compositions, elles sont constituées de préférence par un mélange de peptides comprenant :

25 - au moins un peptide de groupe A tel que défini ci-dessus et au moins un autre peptide sélectionné dans les groupes suivants :

- les peptides sélectionnés dans le **groupe B** constitué par :

- * les peptides de groupe II, tel que défini ci-dessus et

- * les peptides constitués par des fragments d'au moins 13 acides
30 aminés qui sont inclus dans ou comprennent le fragment correspondant aux positions 94-106 de l'allergène majeur du venin d'abeille (API m1) et qui se lie au moins aux

molécules HLA-DR exprimées par les allèles DRB1*0101, DRB1*0401 et DRB1*1101 (molécules DR1, DR4 et DR11), avec une activité de liaison < 1000 nM,

- les peptides sélectionnés dans le **groupe C** constitué par :

* les peptides de groupe III, tel que défini ci-dessus et

5 * les peptides constitués par des fragments d'au moins 13 acides aminés qui sont inclus dans ou comprennent le fragment correspondant aux positions P76-94 de l'allergène majeur du venin d'abeille et qui se lie au moins aux molécules HLA-DR exprimées par les allèles DRB1*0701, DRB1*1101 et DRB1*1501 (molécules DR7, DR11 et DR2), avec une activité de liaison < 1000 nM et

10 - les peptides sélectionnés dans le **groupe D** constitué par :

* les peptides de groupe IV tel que défini ci-dessus et

15 * les peptides constitués par des fragments d'au moins 13 acides aminés qui sont inclus dans ou comprennent le fragment correspondant aux positions P122-134 de l'allergène majeur du venin d'abeille et qui se lie au moins aux molécules HLA-DR exprimées par les allèles DRB1*1101, DRB1*1301 et DRB1*1501 (molécules DR11, DR13 et DR2), avec une activité de liaison < 1000 nM.

20 Selon un autre mode de réalisation desdites compositions, elles comprennent en outre, éventuellement, le peptide correspondant aux positions P18-30 et/ou le peptide correspondant aux positions P45-62 et/ou le peptide correspondant aux positions P 57-74 et/ou le peptide correspondant aux positions P65-82 et/ou le peptide correspondant aux positions P111-123, de l'allergène majeur du venin d'abeille, conformément aux Tableaux IIIa et IIIb ci-après et/ou les peptides incluant les peptides précités.

Tableau IIIa : Peptides représentatifs des différentes zones d'interaction entre l'allergène majeur du venin d'abeille et les molécules HLA-DR (1^{er} gène) codées par le gène DRB1

| 101 | 401 | 1101 | 701 | 301 | 1301 | 1501 |
|---------|----------|----------|--------|--------|----------|----------|
| | | | P18-30 | | | |
| | | | P45-62 | | | |
| | | | | P57-74 | | |
| | | | | | | P65-82 |
| | | | | | | P76-88 |
| | | P77-94 | P77-94 | | | |
| | | | | | | P81-93 |
| P85-97 | P85-97 | P85-97 | P85-97 | P85-97 | P85-97 | |
| P94-106 | P94-106 | P94-106 | | | | |
| | P111-123 | | | | | |
| | | P122-134 | | | P122-134 | P122-134 |

5 **Tableau IIIb : Peptides représentatifs des différentes zones d'interaction entre l'allergène majeur du venin d'abeille et les molécules HLA-DR (2^{ème} gène) dont la chaîne β n'est pas codée par le gène DRB1.**

| Allèles HLA-DR (2 ^{ème} gène) | | | Fréquence cumulée ^a |
|--|---------|--------------------|--------------------------------|
| B5*0101 | B4*0101 | B3*0101 | |
| 21-38 | | | 7,9 |
| 45-62 | | | 7,9 |
| | | 53-70 | 9,2 |
| 77-94 | | 77-94 | 17,1 |
| | 81-93 | | 28,4 |
| 85-97 | | 85-97 ^a | 17,1 |
| | 89-101 | | 28,4 |
| 94-106 | | | 7,9 |
| 111-123 | 111-123 | 111-123 | 45,5 |
| 122-134 | 122-134 | 122-134 | 45,5 |

molécules HLA-DR. Ils font partie des peptides les plus actifs pour une zone donnée et sont le plus court possible.

5 ^a : les fréquences cumulées entre les allèles de gènes différents n'ont un sens que parce que les 2^{èmes} molécules se comportent dans la population caucasienne comme une même série allélique.

De manière avantageuse, dans lesdites compositions :

- les peptides de groupe I peuvent avantageusement être concaténés pour former un seul peptide (P81-97) et/ou
- les peptides de groupe III peuvent avantageusement être concaténés
10 pour former un seul peptide (P76-94) correspondant aux positions P81-97 de l'allergène majeur du venin d'abeille et/ou
- les peptides de groupe II et de groupe III peuvent avantageusement être concaténés, pour former un seul peptide (P76-106) correspondant aux positions P81-97 de l'allergène majeur du venin d'abeille.

15 De manière générale, les compositions selon l'invention comprennent au moins un peptide englobant au moins un de ceux décrits au Tableau III et qui sont adaptés au patient à désensibiliser.

Ces compositions désensibilisantes sont définies à partir des activités de liaison aux molécules HLA-DR des peptides qu'elles comprennent, de la
20 fréquence d'allèles vis-à-vis desquels elles sont actives et de la complémentarité des zones d'interaction ou épitopes que portent lesdits peptides.

Pour un patient, pour lequel on ne connaît pas les molécules HLA-DR qu'il porte, on utilisera de préférence une composition selon l'invention qui comprend au moins un peptide de groupe A.

25 On peut y adjoindre, de manière avantageuse et de manière à augmenter le nombre d'épitopes : un peptide de groupe B ; un peptide de groupe C ; un peptide correspondant à la concaténation d'un peptide de groupe B et d'un peptide de groupe C et/ou un peptide de groupe D.

Pour les patients pour lesquels on connaît les molécules HLA, on
30 utilisera soit les peptides précédemment définis, soit une combinaison de peptides englobant au moins ceux décrits aux Tableaux IIIa et IIIb, qui correspondent aux

allèles que possèdent le patient.

Les peptides inclus dans lesdites compositions ont été avantageusement sélectionnés à l'aide d'un test de liaison HLA-DR/peptides comprenant (i) l'incubation des molécules HLA-DR purifiées, sélectionnées parmi celles concernant plus de 5 % d'une population donnée et notamment les molécules HLA DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13 et DR2, simultanément avec différentes concentrations de fragments de 13 à 18 acides aminés chevauchants et couvrant entièrement la séquence de l'API m1 et avec un réactif R1 constitué d'un fragment peptidique associé à un marqueur non radioactif, tel que la biotine et dont la séquence est différente desdits peptides et est choisie de manière à ce qu'il présente une affinité vis-à-vis de la molécule HLA-DR choisie, telle qu'il puisse être utilisé à une concentration < 200 nM, (ii) le transfert des complexes obtenus sur une plaque de type ELISA, préalablement sensibilisée avec un anticorps spécifique de tous les HLA-DR, (iii) révélation des complexes molécules HLA-DR/réactif R1, fixés au fond de la plaque au moyen de conjugués convenables, tels que streptavidine-phosphatase et d'un substrat fluorescent, (iv) sélection des peptides comprenant des épitopes différents, c'est-à-dire les plus représentatifs des différentes zones d'interaction entre l'allergène majeur du venin d'abeille et les molécules HLA-DR et (v) choix des peptides les plus adaptés, en fonction de la fréquence des allèles vis-à-vis desquels ils présentent une activité de liaison < 1000 nM, correspondant à la concentration de ce peptide qui inhibe 50 % de la liaison du réactif R1 (IC_{50}).

Ces tests permettent, de manière non ambiguë, d'associer à chaque allèle du 1^{er} gène ou du 2^{ème} gène, les séquences des fragments capables de s'y lier ou au contraire qui ne s'y lient pas.

Cette démarche permet de définir des compositions désensibilisantes incluant des peptides qui se lient au plus grand nombre de molécules HLA-DR différentes et qui peuvent être ainsi avantageusement désensibilisantes pour la majorité des patients, même si l'on ne connaît pas leurs molécules HLA.

Cette démarche a en outre l'avantage de permettre la sélection de peptides significativement plus spécifiques vis-à-vis de la plupart des sujets allergiques que les démarches cherchant à sélectionner des peptides sur la base de leur

capacité à stimuler des lymphocytes T de sujets allergiques.

Ainsi, les Inventeurs ont trouvé que seulement certains peptides ont une activité de liaison vis-à-vis de plusieurs des allèles les plus fréquents dans la population caucasienne conformément aux Tableaux IIIa et IIIb.

5 La présente invention a également pour objet des compositions désensibilisantes pour les allergies au venin d'abeille, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une phospholipase A2 de venin d'abeille modifiée, dans laquelle les zones comprenant les peptides tels que définis ci-dessus sont conservées et les zones en dehors des zones précitées sont modifiées, de telle sorte qu'elles ne
10 présentent plus de réactivité aux IgE et au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Lesdites zones sont notamment modifiées par mutation ponctuelle ou délétion. La PLA2 de venin d'abeille est en effet capable d'accueillir de nombreuses mutations et délétions (53, 54). Il est donc possible d'obtenir des mutants
15 n'ayant plus de réactivité aux IgE, comme ceux obtenus pour Bet VI (55). Par exemple, le mutant de PLA2 d'abeille dans lequel la lysine en position 25 a été substituée est beaucoup moins antigénique pour des sérums d'apiculteurs que la molécule native (55).

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une
20 phospholipase A2 de venin d'abeille modifiée, dans laquelle les zones comprenant les peptides tels que définis ci-dessus sont conservées et les zones en dehors des zones précitées sont modifiées, de telle sorte qu'elles ne présentent plus de réactivité aux IgE, pour la préparation d'une composition désensibilisantes pour les allergies au venin d'abeille.

25 Les peptides aptes à être inclus dans une composition désensibilisante pour les allergies au venin d'abeille peuvent avantageusement être sélectionnés par un procédé qui comprend :

(i) l'incubation des molécules HLA-DR purifiées sélectionnées parmi celles concernant soit moins de 5 % d'une population donnée, c'est-à-dire celles
30 constituées par d'autres HLA-DR que les molécules HLA DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13 et DR2, soit des molécules HLA-DR d'un patient donné, simultanément

avec différentes concentrations de fragments de 13 à 18 acides aminés chevauchants et couvrant entièrement la séquence de l'API ml et avec un réactif R1 constitué d'un fragment peptidique associé à un marqueur non radioactif, tel que la biotine et dont la séquence est différente des peptides, tels que définis ci-dessus (groupes A à D) et est choisie de manière à ce qu'il présente une affinité vis-à-vis de la molécule HLA-DR choisie, telle qu'il puisse être utilisé à une concentration < 200 nM, (ii) le transfert des complexes obtenus sur une plaque de microtitration, préalablement sensibilisée avec un anticorps spécifique de toutes les molécules HLA-DR, (iii) la révélation des complexes molécules HLA-DR/réactif R1, fixés au fond de la plaque au moyen de conjugués convenables, tels que streptavidine-phosphatase et d'un substrat fluorescent, (iv) la sélection des peptides comprenant des épitopes différents, c'est-à-dire les plus représentatifs des différentes zones d'interaction entre l'allergène majeur du venin d'abeille et les molécules HLA-DR étudiées et (v) le choix des peptides les plus adaptés, en fonction de la fréquence des allèles vis-à-vis desquels ils présentent une activité de liaison < 1000 nM, correspondant à la concentration de ce peptide qui inhibe 50 % de la liaison du réactif R1 (IC₅₀).

Les conditions d'incubation sont propres à chaque molécule HLA-DR (temps d'incubation, pH, réactif R1, concentration en HLA-DR ou en peptide).

Le réactif R1 est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences suivantes :

PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO:1), spécifique des allèles DRB1*0101, DRB1*0401, DRB1*1101,
EAEQLRAYLDGTGVE (SEQ ID NO:2), spécifique de l'allèle DRB1*1501,
AKTIAYDEEARGLE (SEQ ID NO:3), spécifique de l'allèle DRB1*0301,
25 AAYAAAKAAALAA (SEQ ID NO:4), spécifique de l'allèle DRB1*0701,
TERVRLVTRHIYNREE (SEQ ID NO:5), spécifique de l'allèle DRB1*1301,
ESWGAVWRIDTPDKLTGPFT (SEQ ID NO:6), spécifique des allèles DRB1*1301, DRB3*0101, et
AGDLLAIETDKATI (SEQ ID NO:7), spécifique des allèles DRB1*0701 et
30 DRB4*0101.

D'autres réactifs R1 peuvent être utilisés, notamment ceux décrits

dans Southwood et al. (52).

Pour étudier les molécules HLA-DR (2^{ème} gène), cela nécessite des paires appropriées de peptides biotinylés qui doivent lier la préparation à faible concentration et être sélectifs d'une des deux molécules. Plus précisément, la liaison des peptides biotinylés doit être inhibée efficacement par leur homologue non biotinylé, mais peu perturbée par la forme non biotinylée de l'autre peptide (Tableau X). De tels peptides ont pu être trouvés pour chacune des molécules DRB3*0101, DRB4*0101 ou DRB5*0101.

Au moyen de ces tests, les peptides d'Api m1 qui lient ces molécules ont été définis. Le même ensemble de peptides que précédemment a été utilisé : des peptides de 18 acides aminés qui couvrent la séquence de l'allergène et des peptides de 13 résidus qui couvrent de manière exhaustive des zones particulières. Les résultats obtenus sont illustrés au Tableau X ci-après.

L'allèle DRB5*0101 interagit avec sept régions différentes de Api m1. Seulement quatre et cinq régions de Api m1 peuvent lier respectivement les allèles DRB4*0101 et DRB3*0101. Elles sont principalement situées dans la partie centrale et C-terminale de l'allergène. Les peptides P111-123 et 122-134 lient en effet les trois deuxièmes molécules. Il est également intéressant de noter qu'il existe des peptides communs aux 1^{ères} et 2^{èmes} molécules DR, notamment les peptides P81-93 et P85-97.

Tableau X : Sensibilité et sélectivité des traceurs peptidiques biotinylés.

| Peptides | 1 ^{ères} DR | | 2 ^{èmes} DR | |
|-------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| | allèle | IC ₅₀ (nM) | allèle | IC ₅₀ (nM) |
| B1 21-36 | B1*1301 | 275 | B3*0101 | 35000 |
| LOL 191-210 | B1*1301 | >100000 | B3*0101 | 5 |
| YKL | B1*0701 | 35 | B4*0101 | 950 |
| E2/E168 | B1*0701 | 5000 | B4*0101 | 2 |
| A3 152-166 | B1*1501 | 33 | B5*0101 | 85000 |
| HA 306-318 | B1*1501 | 2500 | B5*0101 | 6,5 |

La sélectivité de chaque peptide est évaluée par l'IC₅₀ du peptide non

biotinylé testé sur chacune des molécules. Pour chaque paire, le premier peptide est celui qui est sélectif de la 1^{ère} molécule DR et le deuxième de la 2^{ème} molécule DR.

Les séquences des peptides sont les suivantes : B1 21-36 (TERVRLVTRHIYNREE) (SEQ ID NO:5) (62), LOL 191-210
5 (ESWGAVWRJDTDPDKLTGPFT) (SEQ ID NO:6) (63), YKL (AAYAAAKAAALAA) (SEQ ID NO:4) (64), HA 306-318 (PKYVKQNTLKLAT) (SEQ ID NO:1) (65), A3 152-166 (EAEQLRAYLDGTGVE) (SEQ ID NO :2) (65), E2/E168 (AGDLLAIETDKATI) (SEQ ID NO:7).

De manière surprenante, le procédé de sélection selon l'invention est
10 adapté à n'importe quelle molécule d'HLA-DR.

La présente invention a également pour objet un kit de sélection de peptides aptes à désensibiliser un sujet allergique au venin d'abeille, caractérisé en ce qu'il comprend différentes concentrations de fragments de 13 à 18 acides aminés chevauchants et couvrant entièrement la séquence de l'API m1, un ensemble de réac-
15 tifs R1 constitués chacun d'un fragment peptidique associé à un marqueur non radioactif, tel que la biotine et dont la séquence est différente des peptides tels que définis ci-dessus (groupes A à D) et est choisie de manière à ce qu'il présente une affinité vis-à-vis de la molécule HLA-DR choisie, telle qu'il puisse être utilisé à une concentration < 200 nM et un anticorps spécifique de toutes les molécules HLA-DR.

20 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention, ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 représente la séquence protéique de la phospholipase A2
25 (API m1) du venin d'abeille, déduite de celle de l'ADN complémentaire,

- la figure 2 illustre l'activité de liaison aux molécules HLA-DR des peptides de treize acides aminés qui couvrent la séquence 15-37 de l'allergène majeur du venin d'abeille. Les résultats sont exprimés sous la forme de $1/IC_{50}$. L'unité est la M^{-1} ;

- la figure 3 illustre l'activité de liaison des peptides de treize acides aminés qui couvrent la séquence 107-134 de l'allergène majeur du venin d'abeille aux molécules HLA-DR. Les résultats sont exprimés sous la forme $1/IC_{50}$. L'unité est la M^{-1} ;

5 - la figure 4 illustre les fréquences des déterminants de Api m1 dans la population caucasienne. Cette représentation est basée sur les fréquences des allèles étudiés dans la population française. Dans d'autres populations caucasiennes, on retrouve sensiblement le même profil ;

- la figure 5 illustre la structure des gènes du CMH de classe HLA-
10 DR par haplotype ; dans cette figure, les gènes sont schématisés par des blocs noirs et les pseudo-gènes par des blocs hachurés. Le nom des gènes est donné au dessus du bloc et celui des principaux allèles présents dans l'haplotype est reporté sous le bloc ;

- la figure 6 illustre la localisation des résidus d'ancrage du peptide P85-97 sur les molécules HLA-DR. Chaque position a été substituée par une alanine
15 ou une lysine. Les résultats sont donnés en activité relatives par rapport au peptide P85-97A (0,01 signifie une perte relative d'un facteur 100) ;

- la figure 7 illustre les modes de liaison de la séquence 81-97 aux molécules HLA-DR. Les blocs schématisent le site de liaison des molécules HLA-DR que caractérisent les poches P1, P4, P6, P7 et P9. Une couleur et un numéro en chiffre
20 romain ont été attribués à chaque mode afin de faciliter leur visualisation ; et

- la figure 8 illustre la réponse des lymphocytes T de patients allergiques au venin d'abeille, aux peptides qui couvrent la séquence d'Api m1 ; les PBMC des patients allergiques ont été cultivées pendant 7 jours en présence d'Api m1. A J=7 et J=10 de l'IL2 (50 U/ml) a été rajoutée. A J=14, les cellules ont été récoltées puis
25 incubées en présence des différents peptides. La prolifération des cellules a été estimée par incorporation de thymidine tritiée. Composition des pools : pool 1 : P1-18, P5-22, P9-26, pool 2 : P13-30, P17-34, P21-38, pool 3 : P25-42, P29-46, P33-50, P37-54, pool 4 : P41-58, P45-62, P49-66, pool 5 : P53-70, P57-74, pool 6 : P61-78, P65-82, P69-86, P73-90, pool 7 : P77-94, P81-98, P85-102, P89-106, P93-110, pool 8 : P97-
30 114, P101-118, pool 9 : P105-122, P109-126, P113-130, P117-134.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Principe des tests de liaison.

5 - Synthèse des peptides

Les peptides qui couvrent la séquence de l'allergène majeur du venin d'abeille (figure 1) ont été choisis à partir de la séquence déduite de celle de l'ADN complémentaire correspondant (36). Tous les peptides ont été synthétisés selon la stratégie Fmoc en synthèse parallèle sur phase solide, purifiés par HPLC et contrôlés
10 par spectrométrie de masse (ES-MS).

Purification des molécules HLA-DR

Les molécules HLA-DR sont purifiées à partir de différentes lignées EBV homozygotes (52) par immunoaffinité. On peut notamment utiliser la méthode décrite dans Southwood et al. (52). Leur origine et les différents allèles qui les caracté-
15 risent sont décrits dans le Tableau IV.

Tableau IV

| Lignées | Spécificités | Allèles DRB1 | Autres allèles DRB |
|-------------|--------------|--------------|--------------------|
| LG2 (52) | HLA-DR1 | DRB1*0101 | - |
| HOM2 | | | |
| SCHU | HLA-DR2 | DRB1*1501 | DRB5*0101 |
| MAT (52) | HLA-DR3 | DRB1*0301 | DRB3*0101 |
| STEILIN | | | |
| BOLETH | HLA-DR4 | DRB1*0401 | DRB4*0101 |
| PREISS (52) | | | |
| PITOUT (52) | HLA-DR7 | DRB1*0701 | DRB4*0101 |
| SWEIG (52) | HLA-DR11 | DRB1*1101 | DRB3*0202 |
| HHKB (46) | HLA-DR13 | DRB1*1301 | DRB3*0101 |

Les hybridomes sécréteurs d'un anticorps monomorphe spécifique des molécules HLA-DR est notamment celui décrit dans Southwood et al. (52)
20 ou celui décrit dans Posch et al. (42). Les anticorps sont purifiés à partir de surna-

geants de culture sur des colonnes de Protéine A-Sépharose. Ces anticorps sont couplés sur des colonnes Sépharose 4B ou Protéine A-Sépharose pour la purification des molécules HLA-DR.

. Tests de liaison HLA-DR/peptides

5 Les tests de liaison des peptides aux molécules HLA-DR sont des tests en compétition avec une révélation immuno-enzymatique, initialement mis au point par Hill sur la molécule HLA-DR (37). Ils sont effectués en plaques 96 puits, ce qui permet d'étudier dans la même expérience de nombreux échantillons. Brièvement, les molécules HLA-DR purifiées sont incubées avec un peptide biotinylé qui sert de
10 traceur et différentes concentrations du peptide à tester.

Après 24 à 72 heures d'incubation, les échantillons sont neutralisés, puis 100 µl de chaque échantillon sont transférés sur une plaque ELISA préalablement sensibilisée par l'anticorps monomorphe spécifique des molécules HLA-DR. Les complexes molécules HLA-DR/peptides biotinylés, fixés au fond de la plaque par
15 l'intermédiaire de l'anticorps monomorphe spécifique des molécules HLA-DR sont révélés au moyen de conjugué streptavidine-phosphatase et d'un substrat fluorescent. L'activité de chaque peptide est caractérisée par la concentration de ce peptide qui inhibe 50% de la liaison du peptide biotinylé (IC_{50}).

. Choix et optimisation des tests de liaison

20 *Choix des allèles (1^{er} gène)*

Les allèles étudiés sont tous les allèles de la population française dont la fréquence dépasse les 5% de la population.

Il s'agit des allèles DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1301 et DRB1*1501 (Tableau I). Ils représentent à
25 eux seuls 53 à 82% des allèles des populations caucasiennes et font partie de différentes spécificités des séries HLA-DR.

Choix des allèles (2^{ème} gène)

Les allèles étudiés sont les allèles rencontrés les plus fréquemment. Il s'agit des allèles HLA-DRB3*0101, HLA-DRB4*0101 et HLA-DRB5*0101 (voir
30 Tableau IIb).

Spécificité des tests

Le choix des peptides biotinylés est l'élément déterminant de la spécificité du test. La plupart des cellules utilisées possèdent deux molécules HLA-DR différentes qui sont toutes les deux purifiées par un anticorps monomorphique spécifique des molécules HLA-DR et toutes les deux reconnues par le même anticorps. De manière à étudier sans ambiguïté la liaison d'un peptide à l'allèle DRB1, il est nécessaire de s'assurer que le peptide biotinylé lie cet allèle et ne lie pas le produit de l'autre gène.

Dans ce but, un certain nombre de peptides, décrits dans le Tableau V, ont été utilisés.

Tableau V

| Réactif R1 | Séquences | 1 ^{er} gène (Allèles DRB1) | 2 ^{eme} gène (Allèles DRB3, DRB4, DRB5) | Références |
|-----------------------------|--------------|--|--|---------------------------------------|
| HA 306-318 (=HA 307-319) | SEQ ID NO:1 | DRB1*0101 DRB1*0401 DRB1*1101 DRB1*1501 | DRB5*0101 | 37-39 37, 40, 41, 42 38, 39, 42 |
| A3 152-166 | SEQ ID NO:2 | DRB1*1501 | DRB5*0101 | 43 |
| MT 2-16 | SEQ ID NO: 3 | DRB1*0301 | | 44 |
| YKL | SEQ ID NO:4 | DRB1*0701 | DRB4*0101 | 41 |
| B1 21-36 | SEQ ID NO:5 | DRB1*1301 | DRB3*0101 | 46 |
| LOL 191-210 | SEQ ID NO:6 | DRB1*1301 | DRB3*0101 | 63 |
| E2/E168 | SEQ ID NO:7 | DRB1*0701 | DRB4*0101 | |

Pour HLA-DRB1*0101, DRB1*0401 et DRB1*1101, le peptide ha 306-318 que d'autres auteurs avaient précédemment utilisé dans des tests de liaison sur ces allèles (37, 41), a été utilisé.

De même, pour DRB1*0301 et DRB1*1501, les traceurs utilisés (réactif R1) dérivent de traceurs précédemment décrits (44), (45).

Pour DRB1*0701, le peptide YKL a été décrit comme étant un très bon ligand (41) alors que le peptide B1 21-36 est un ligand naturel de DRB1*1301 (46). Ni l'un ni l'autre n'ont été déjà utilisés comme traceurs.

Conditions et sensibilité des tests

Pour chaque molécule HLA-DRB1, la concentration en molécules du CMH II, la concentration du peptide biotinylé, le pH d'incubation et le temps d'incubation ont été optimisés. Pour les molécules HLA-DRB1*101, DRB1*0401 et DRB1*0701, les conditions de tests en ELISA sont proches de celles déjà décrites par d'autres auteurs (37, 41). Pour les autres molécules HLA-DRB1 qui ont été étudiées, il n'y a pas de tests en ELISA décrits dans la littérature. Le détail des conditions utilisées est décrit dans le Tableau VI.

Tableau VI

| Allèles | Concentration protéine (µg/ml) | Traceurs | Concentration traceur (nM) | pH optimal | Temps d'incubation (h) |
|-----------|--------------------------------------|------------|----------------------------------|---------------|------------------------------|
| DRB1*0101 | 0,6 | HA 306-318 | 10 | 6 | 24 |
| DRB1*0301 | 2,3 | MT 2-16 | 50 | 4,5 | 72 |
| DRB1*0401 | 1,6 | HA 306-318 | 30 | 6 | 24 |
| DRB1*0701 | 0,4 | YKL | 10 | 5 | 24 |
| DRB1*1101 | 1,3 | HA 306-318 | 20 | 5 | 24 |
| DRB1*1301 | 0,7 | B1 21-36 | 200 | 4,5 | 72 |
| DRB1*1501 | 0,5 | A3 152-166 | 10 | 4,5 | 24 |

10

La sensibilité de chaque test est reflétée par les IC_{50} observées avec les peptides non-biotinylés qui correspondent aux traceurs (Tableau VII et Tableau X).

Tableau VII

| | | DRB1 Alleles | | | | | | |
|----------|------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Peptides | | 101 | 401 | 1101 | 701 | 301 | 1301 | 1501 |
| 5 | P1-18 | 2300 | 7500 | - | 83000 | - | - | 11000 |
| | P5-22 | 1900 | 10000 | - | 58000 | - | - | 22000 |
| | P9-26 | - | - | - | - | - | - | 82000 |
| | P13-30 | 10000 | 5000 | 8000 | 880 | - | 20000 | - |
| | P17-34 | 3500 | 2000 | 1300 | 560 | 67000 | 4300 | 5500 |
| 10 | P21-38 | 1600 | 3000 | 1500 | 160 | 23000 | - | 85000 |
| | P25-42 | - | - | - | 50000 | - | - | - |
| | P29-46 | - | 40000 | - | 85000 | 1500 | - | - |
| | P33-50 | - | 80000 | - | 78000 | 13000 | - | 90000 |
| | P37-54 | - | 80000 | - | 88000 | - | - | - |
| | P41-58 | - | - | - | 75000 | - | - | - |
| | P45-62 | - | 68000 | - | 640 | 4300 | 1100 | 19000 |
| | P49-66 | - | - | - | 1800 | 17000 | 15000 | 95000 |
| | P53-70 | - | - | - | 85000 | 120 | - | - |
| | P57-74 | - | 35000 | 70000 | 75000 | 40 | - | 63000 |
| 15 | P61-78 | 55000 | 29000 | 67000 | 23000 | 25000 | - | 55000 |
| | P65-82 | 4000 | 2500 | 4000 | 2100 | 13000 | - | 730 |
| | P69-86 | - | 15000 | - | 75000 | - | - | 490 |
| | P73-90 | - | - | - | 75000 | - | - | 23 |
| | P77-94 | 10000 | 13000 | 570 | 280 | 50000 | - | 220 |
| | P81-98 | 300 | 300 | 530 | 130 | 400 | 650 | 750 |
| | P85-102 | 70 | 300 | 850 | 100 | 320 | 300 | 1900 |
| | P89-106 | 180 | 140 | 600 | 7600 | 50000 | - | 38000 |
| | P93-110 | 350 | 220 | 750 | 72000 | 70000 | - | - |
| | P97-114 | - | - | - | 77000 | 75000 | - | - |
| 20 | P101-118 | - | - | - | 30000 | - | - | - |
| | P105-122 | - | 950 | 30000 | 16000 | - | - | 80000 |
| | P109-126 | - | 1500 | 7000 | 12000 | 13000 | 10000 | 35000 |
| | P113-130 | - | 4500 | 11000 | 6100 | 3500 | - | 79 |
| | P117-134 | - | 55000 | 67 | 3700 | - | 350 | 56 |
| | references | 31 | 44 | 38 | 34 | 100 | 320 | 14 |

- 25 Activité de liaison aux molécules HLA-DR des peptides de dix-huit acides aminés qui couvrent la séquence de l'allergène majeur du venin d'abeille.
- : activité ≥ 100000 nM

Les résultats sont exprimés sous la forme d' IC_{50} . L'unité est le nM. Les IC_{50} des meilleurs peptides (IC_{50} inférieures à 1000 nM) ont été entourées

- Elles varient de 14 à 44 nM pour les allèles 101, 401, 1101, 701 et
30 1501 qui sont des valeurs très satisfaisantes. Elles ne sont que de 100 à 320 nM pour respectivement les allèles 301 et 1301 et traduisent une sensibilité de qualité moyenne.

Cartographie des déterminants de API m1 restreints aux molécules HLA-DR étudiées

Localisation des déterminants de API m1 : au moyen de peptides de 18 résidus

5 Les peptides qui sont naturellement présents sur les molécules HLA-DR ont des tailles qui varient entre 13 et 25 acides aminés environ, la taille la plus fréquemment rencontrée étant de 15 acides aminés. De manière à optimiser la recherche des peptides de API m1 capables de se lier aux molécules HLA-DR, nous avons synthétisé trente peptides de 18 acides aminés qui se chevauchent de 14 acides aminés et qui donc contiennent tous les peptides de 15 résidus possibles de la séquence de API m1. Les capacités de liaison de chacun de ces peptides ont été testées sur les 7 allèles que nous avons retenus et sont exprimées sous la forme IC_{50} (Tableau VII).

15 Les allèles 101, 401 et 1101 ont un profil d'activité très similaire et en particulier acceptent les 4 peptides (P81-98, P85-102, P89-106 et P93-110) comme ligands. Ils présentent toutefois des différences. Le peptide P105-122 lie en effet l'allèle 401, alors que les peptides P77-94 et P117-134 lient l'allèle 1101. L'allèle 701 possède 7 peptides actifs (P13-30, P17-34, P21-38, P45-62, P77-94, P81-98 et P85-102) alors que 4 peptides (P81-98, P85-102, P53-70 et P57-74) sont actifs vis-à-vis de l'allèle 301. Les peptides P81-98 et P85-102 lient l'allèle 1301 avec une efficacité comparable à celle du peptide P117-134. Finalement, deux régions actives existent pour l'allèle 1501 et comprennent d'une part les peptides P65-82, P69-86, P73-90, P77-94, P81-98 et P85-102 et d'autre part les peptides P113-130 et P117-134.

25 Clairement chaque allèle possède un profil de liaison des peptides d'API m1 qui lui est propre. Certains peptides ne se lient qu'à un seul allèle (par exemple P105-122 à l'allèle 401, P69-86 et P73-90 à l'allèle 1301). D'autres, au contraire, se lient à plusieurs allèles. C'est le cas en particulier du peptide P81-98, qui lie de manière significative les sept allèles étudiés et du peptide P85-102 qui lie six allèles de manière significative. Dans de nombreux cas, un peptide est commun à deux ou plusieurs allèles. Ces peptides communs définissent principalement trois zones

30

distinctes de la séquence d'API m1: i) une partie N-terminale que forment les peptides P13-30, P17-34, P21-38, ii) une partie centrale constituée par les peptides P77-94 à P93-110 et iii) une partie C-terminale qu'englobent les peptides P113-122 à P117-134. On observe également que treize peptides sur les trente testés ont des activités de liaison > à 1000 nM, quelle que soit la molécule de CMH II étudiée. Ils sont donc peu ou pas actifs.

Le Tableau VIII ci-après illustre l'activité de liaison des peptides de 13 acides aminés qui couvrent la zone 73-108 de API m1 aux molécules HLA-DR.

Tableau VIII

| 10 | Peptides | DRB1 Alleles | | | | | | |
|----|----------|--------------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| | | 101 | 401 | 1101 | 701 | 301 | 1301 | 1501 |
| | P73-85 | | | | 28000 | | | 210 |
| | P74-86 | | | | 65000 | | | 330 |
| | P75-87 | | | | 15000 | | | 230 |
| | P76-88 | | | | 2200 | | | 160 |
| | P77-89 | | | 2200 | 1400 | | | 780 |
| 15 | P78-90 | | 10000 | 3000 | 1100 | | | 190 |
| | P79-91 | | 5000 | 3000 | 1300 | | | 1600 |
| | P80-92 | | - | 6000 | 2800 | | | 1600 |
| | P81-93 | | 2500 | 3200 | 1700 | | | 400 |
| | P82-94 | 8000 | 530 | 4300 | - | | - | 33000 |
| | P83-95 | 4000 | 280 | 560 | 4500 | 2000 | - | - |
| | P84-96 | 1900 | 2200 | 1700 | 1700 | 3700 | - | - |
| | P85-97 | 120 | 210 | 570 | 63 | 600 | 58 | 33000 |
| 20 | P86-98 | 2000 | - | 1800 | 470 | 1100 | 150 | 68000 |
| | P87-99 | 2500 | 22000 | 45000 | 280 | 1200 | - | 6500 |
| | P88-100 | 5300 | 14000 | - | 1200 | 12000 | - | 15000 |
| | P89-101 | 13000 | 13000 | - | 6000 | 45000 | - | 35000 |
| | P90-102 | 3500 | 1200 | 18000 | 65000 | 60000 | | 40000 |
| | P91-103 | 870 | 380 | 3500 | 23000 | | | - |
| | P92-104 | 270 | 120 | 7700 | - | | | - |
| | P93-105 | 240 | 60 | 1200 | 50000 | | | - |
| 25 | P94-106 | 200 | 280 | 1000 | - | | | - |
| | P95-107 | 530 | 570 | - | - | | | - |
| | P96-108 | 1500 | 1400 | - | | | | - |

Activité de liaison des peptides de 13 acides aminés qui couvrent la zone 73-108 de l'allergène majeur du venin d'abeille aux molécules HLA-DR.

- : activité ≥ 100000 nM

30 Les résultats sont exprimés sous la forme d' IC_{50} . L'unité est le nM. Les IC_{50} des meilleurs peptides (IC_{50} inférieures à 1000 nM) ont été entourées.

Localisation précise des déterminants de API m1

De manière à mieux définir les zones de contact entre les peptides actifs et les molécules de CMH II, tous les peptides de treize résidus qui couvrent les zones actives ont été synthétisés. La taille de treize acides aminés a été choisie comme
5 compromis. Elle correspond à la taille minimale des peptides présents naturellement sur les molécules de CMH II et devrait être suffisamment petite pour discriminer deux surfaces de contact contenues dans un seul peptide de dix-huit acides aminés.

11 peptides qui couvrent exhaustivement la partie N-terminale 15 à 37 ont été testés sur les allèles 101, 401, 701, 1101 et 1301 (figure 2). Pour l'allèle
10 701, les peptides P18-30 à P22-34 présentent une activité significative de liaison qui dans le cas du peptide P18-30 est équivalente à celle du peptide de dix-huit acides aminés P21-38.

Les allèles 401, 101 et 1101 lient sensiblement les mêmes peptides que l'allèle 701. Cependant, les activités de liaison observées sont plus faibles, ce qui
15 est en accord avec celles obtenues pour les peptides de dix-huit acides aminés.

La partie centrale a été étudiée sur les sept allèles au moyen de vingt-quatre peptides de treize résidus. Pour l'allèle 101, les peptides P85-97 d'une part et P91-103 à P95-107 d'autre part définissent deux zones distinctes d'interaction. Ces deux zones se retrouvent également pour les allèles 401 et 1101 mais avec de petites
20 variations. La première comporte en plus du peptide P85-97, les peptides P82-94 et P83-95 pour l'allèle 401 et le peptide P83-95 pour l'allèle 1101. La deuxième zone de contact est strictement identique entre l'allèle 401 et 101 alors qu'elle est réduite à un seul peptide (P94-106) pour l'allèle 1101. L'allèle 701 se caractérise par trois peptides ayant une bonne activité de liaison (P85-97, P86-98 et P87-99) qui correspond à celle
25 des peptides de dix-huit acides aminés P81-98 et P85-102. La bonne activité de liaison du peptide P77-94 sur l'allèle 701 précédemment décrite n'est observée pour aucun des peptides treize résidus qui couvrent cette zone, les peptides P76-88 à P81-93 ayant une activité sensiblement moindre.

Le peptide P85-97 possède pour les allèles 301 et 1301, une activité
30 de liaison, similaire à celle des peptides de 18 acides aminés P81-98 et P85-102, qui le contiennent. L'allèle 1301 accepte également le peptide P86-105 comme ligand. Pour

l'allèle 1501, sept peptides dont six consécutifs (P73-85 à P78-90) et un isolé (P81-93) reflètent l'activité des trois peptides de dix-huit acides aminés (P73-90, P77-94 et P81-98).

5 Finalement, la partie C-terminale de API m1 a été étudiée pour les allèles 401, 1501, 1101 et 1301 au moyen de seize peptides de treize résidus. L'allèle 401 se caractérise par six peptides actifs (P109-121 à P114-126) alors que sept autres peptides (P116-128 à P122-14) se lient avec une forte affinité à 1501. Les peptides P121-133 et 122-134 sont également très actifs pour les allèles 1101 et 1301.

 Ces résultats décrivent la localisation précise des déterminants de liaison de l'allergène majeur du venin d'abeille pour les sept allèles retenus et montrent
10 clairement les différences et les similitudes entre les allèles pour les différents peptides d'API m1. De manière à rendre compte au mieux de l'activité et de la localisation de ces déterminants, il a été retenu, pour chacun d'entre eux, un peptide représentatif, le plus court possible et dont l'activité de liaison reflète celle du déterminant (Tableau
15 III). On notera tout particulièrement que le peptide P85-97 est représentatif d'un déterminant pour les allèles 101, 401, 1101, 701, 301 et 1301 et que d'autres déterminants sont avantageusement situés près de ce peptide (P76-88, P77-94, P81-93, P94-106).

20 *Fréquences des déterminants de API m1 dans la population caucasienne*

 De manière à évaluer l'impact des peptides les plus actifs (activité inférieure à 1000 nM) au sein de la population caucasienne, il a été calculé, pour chacun, la fréquence cumulée des allèles qu'ils sont capables de lier (figure 4). Appliquée à l'ensemble des peptides de 18 acides aminés qui couvrent entièrement la
25 séquence de l'allergène majeur, cette représentation permet de pondérer l'activité des peptides testés. On observe nettement que la zone centrale allant du peptide P77-94 au peptide P93-110 est celle qui a le plus d'impact dans la population. Le peptide P81-98 se liant avec une bonne affinité à tous les HLA DR étudiés, couvre à lui seul 63 % de la population et cumule l'impact des déterminants portés par les peptides P85-97 et
30 P81-93. L'adjonction de séquences en N et C-terminal permet d'ajouter à cette combinaison de déterminants d'autres zones d'interaction telles que P76-88, P77-94 et P93-

106 qui concernent des pourcentages non négligeables de la population. Enfin, on remarque en C-terminal, l'impact des peptides P117-134 ou 122-134 supérieur à 20 %.

EXEMPLE 2 : Corrélation peptides sélectionnés/prolifération cellulaire.

Les peptides qui se lient aux molécules HLA ne sont pas forcément
5 stimulants pour les lymphocytes T. Ils peuvent en effet ressembler à des peptides du soi, si bien qu'aucun lymphocyte T ne sera capable de les reconnaître. En revanche, il a été préalablement montré que tous les peptides qui stimulent des lymphocytes T font partie des meilleurs peptides qui se lient aux molécules du CMH II (60). La liaison aux molécules du CMH II est donc une condition nécessaire mais pas suffisante pour
10 permettre à un peptide d'être reconnu par les lymphocytes T. De manière à vérifier que les peptides qui ont été identifiés sont effectivement capables de stimuler des lymphocytes T de patients allergiques, leur capacité de stimulation a été testée (figure 8). Les cellules utilisées sont les cellules sanguines du sang périphérique de personnes allergiques au venin d'abeille. Ces personnes sont venues à l'Hôpital Rothschild pour
15 être désensibilisées et ont accepté de participer à cette étude (DGS n° 980457). Compte tenu du faible nombre de cellules, les peptides ont été regroupés en différents pools. Les cellules d'un patient n'a donné lieu à aucune prolifération (non montré). Sur les six patients pour lesquels une réactivité est observée, on observe une forte variabilité dans l'intensité de la réponse aux peptides, dans la nature et le nombre de
20 peptides actifs. Toutefois, on remarque que sur les 6 patients, 5 répondent au pool 7 qui comprend des peptides qui couvrent la zone 77-111 et 3 répondent au pool 9 qui couvre la zone 105-134.

Les autres peptides peuvent répondre fortement mais de manière propre à un patient donné (exemple : pool 3 avec le patient HD). En conséquence, ces
25 résultats confirment l'intérêt de l'utilisation de la séquence 76-106 pour la désensibilisation et dans une moindre mesure de la région C terminale : 105-134.

REFERENCES

1. MULLER U.R. et al., *Monogr. Allergy*, 1993, 31, 131.
- 30 2. MULLER U.R. et al., *Clin. Exp. Allergy*, 1998, 28, 4.
3. MULLER U. et al., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1992, 89, 529.

4. KING T.P. et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1976, 172, 661.
5. V. LIEBERS et al., *Clin. Exp. Allergy*, 1996, 26, 494.
6. CHRETIEN I. et al., *Eur. J. Immunol.*, 1990, 20, 243.
7. HUSSAIN R. et al., *J. Immunol.*, 1992, 148, 2731.
- 5 8. ROCKLIN R.E. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1980, 302, 1213.
9. AKDIS C.A. et al., *J. Clin. Invest.*, 1996, 98, 1676.
10. KAMMERER R. et al., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1997, 100, 96.
11. JUTEL M. et al., *J. Immunol.*, 1995, 154, 4187.
12. SECRIST H. et al., *J. Exp. Med.*, 1993, 178, 2123.
- 10 13. MILICH D.R. et al., *J. Immunol.*, 1989, 143, 3148.
14. BURSTEIN H.J. et al., *J. Immunol.*, 1992, 148, 3687.
15. GERMAIN R.N. et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 1993, 11, 403.
16. BRINER T.J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 7608.
17. HOYNE G.F. et al., *J. Exp. Med.*, 1993, 178, 1783.
- 15 18. BAUER L. et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 1997, 107, 536.
19. VRTALA S. et al., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1997, 113, 246.
20. PESCE A.J. et al., *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1990, 92, 88.
21. LITWIN A. et al., *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1988, 87, 361.
22. MULLER U., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1998, 101, 747.
- 20 23. DHILLON M., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1992, 90, 42.
24. CARBALLIDO J.M., *J. Immunol.*, 1993, 150, 3582.
25. DUDLER T. et al., *Eur. J. Immunol.*, 1995, 25, 538.
26. NORMAN P.S. et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996, 154, 1623.
27. TAKAI T. et al., *Nat Biotechnol.*, 1997, 15, 754.
- 25 28. SMITH A.M. et al., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1998, 101, 423.
29. FERREIRA F. et al., *Faseb J.*, 1998, 12, 231.
30. KAMMERER R. et al., *Clin Exp Allergy*, 1997, 27, 1016.
31. VAN NEERVEN R.J. et al., *Immunol. Today*, 1996, 17, 526.
32. FAUX J.A. et al., *Clin. Exp. Allergy*, 1997, 27, 578.
- 30 33. LYMPANY P. et al., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1990, 86, 160.
34. LUCAS A. et al., *Immunogenetics*, 1986, 23, 417.

35. COLOMBANI J., 1993, John Libbey Eurotext, *HLA : fonctions immunitaires et applications médicales*.
36. KUCHLER K. et al., *Eur. J. Biochem.*, 1989, 184, 249.
37. HILL C.M. et al., *J. Immunol.*, 1994, 152, 2890.
- 5 38. ROCHE P.A. et al., *J. Immunol.*, 1990, 144, 1849.
39. O'SULLIVAN D. et al., *J. Immunol.*, 1990, 145, 1799.
40. SETTE A. et al., *J. Immunol.*, 1993, 151, 3163.
41. MARSHALL K.W. et al., *J. Immunol.*, 1994, 152, 4946.
42. POSCH P.E. et al., *Eur. J. Immunol.*, 1996, 26, 1884.
- 10 43. VOGT A.B. et al., *J. Immunol.*, 1994, 153, 1665.
44. GELUK A. et al., *J. Immunol.*, 1992, 149, 2864.
45. SIDNEY J. et al., *J. Immunol.*, 1992, 149, 2634.
46. DAVENPORT M.P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 6567.
47. HAMMER J. et al., *Adv. Immunol.*, 1997, 66, 67.
- 15 48. SHIPOLINI R.A. et al., *Eur. J. Biochem.*, 1974, 48, 465.
49. MAILLERE B. et al., *Mol. Immunol.*, 1995, 32, 1073.
50. MAILLERE B. et al., *Mol. Immunol.*, 1995, 32, 1377.
51. COTTON J. et al., *Int. Immunol.*, 1998, 10, 159.
52. SOUTHWOOD S. et al., *J. Immunol.*, 1998, 160, 3363-3373.
- 20 53. NICOLAS JP. et al., *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 11, 7173-7181.
54. GHOMASHCHI F. et al., *Biochem.*, 1998, 37, 6697-6710.
55. DUDLER T. et al., *J. Immunol.*, 1994, 152, 5514-5522.
56. IRLE C. et al., *J. Exp. Med.*, 1988, 167, 853.
57. FRIEDL-HAJEK R. et al., *Clin. Exp. Allergy*, 1999, 29, 478.
- 25 58. KIM J. et al., *J. Immunol.*, 1997, 159, 335.
59. SHIMODA S. et al., *J. Exp. Med.*, 1995, 181, 1835.
60. TEXIER C. et al., *Int. Immunol.*, 1999, 11.
61. RAMMENSEE H.G. et al., *Immunogenetics*, 1995, 41, 178.
62. DAVENPORT M.P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 6567.
- 30 63. SIDNEY J.C. et al., *J. Immunol.*, 1992, 149, 2634.
64. MARSHALL K.W. et al., *J. Immunol.*, 1994, 152, 4946.

65. VOGT A.B. et al., Immunol., 1994, 153, 1665.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les
5 variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Peptides aptes à désensibiliser un sujet allergique au venin d'abeille, caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés dans le groupe constitué par : le fragment (1) correspondant aux positions P85-97 de l'allergène majeur du venin d'abeille, le fragment (2) correspondant aux positions P81-93 de l'allergène majeur du venin d'abeille, le fragment (3) correspondant aux positions P94-106 de l'allergène majeur du venin d'abeille, le fragment (4) correspondant aux positions P76-88 de l'allergène majeur du venin d'abeille, le fragment (5) correspondant aux positions P77-94 de l'allergène majeur du venin d'abeille, et le fragment (6) correspondant aux positions P122-134 de l'allergène majeur du venin d'abeille, les fragments (1) et (2) formant le groupe I ; le fragment (3) formant le groupe II ; les fragments (4) et (5) formant le groupe III et le fragment (6) formant le groupe IV et les fragments mutés desdits fragments (1) à (6) qui présentent une activité de liaison aux molécules du CMH de classe II identiques ou supérieures à celles desdits fragments (1) à (6).

2°) Peptides selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils sont polymérisés.

3°) Peptides selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisés en ce qu'au moins l'une des positions P1, P4, P6 et P9 des fragments (1), en référence à la figure 7 est mutée.

4°) Peptides selon la revendication 3, caractérisés en ce que lesdits fragments (1) comportent l'un des acides aminés mutés suivants : N89L, N89T, C95A, G84L, G84I.

5°) Peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisés en ce qu'au moins l'une des positions P-2, P-1, P2, P3, P5, P8, P10 et P11 des fragments (1), en référence à la figure 7, est mutée.

6°) Compositions désensibilisantes pour les allergies au venin d'abeille, caractérisées en ce qu'elles comprennent :

- au moins un peptide sélectionné dans le groupe A constitué par :

* les peptides de groupe I, selon l'une quelconque des revendications

1 à 5, et

* les peptides constitués par des fragments d'au moins 13 acides

aminés qui sont inclus dans ou comprennent le fragment correspondant aux positions P81-97 de l'allergène majeur du venin d'abeille (API m1) et qui se lie au moins aux molécules HLA-DR codées par les allèles HLA DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1301 et DRB1*1501 (molécules DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13 et DR2), avec une activité de liaison < 1000 nM et

- au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

7°) Compositions selon la revendication 6, caractérisées en ce qu'elles sont constituées de préférence par un mélange de peptides comprenant :

10 - au moins un peptide de groupe A tel que défini à la revendication 6 et au moins un autre peptide sélectionné dans les groupes suivants :

- les peptides sélectionnés dans le **groupe B** constitué par :

* les peptides de groupe II selon la revendication 1 ou la revendication 2 et

15 * les peptides constitués par des fragments d'au moins 13 acides aminés qui sont inclus dans ou comprennent le fragment correspondant aux positions 94-106 de l'allergène majeur du venin d'abeille (API m1) et qui se lie au moins aux molécules HLA-DR exprimées par les allèles DRB1*0101, DRB1*0401 et DRB1*1101 (molécules DR1, DR4 et DR11), avec une activité de liaison < 1000 nM,

20 - les peptides sélectionnés dans le **groupe C** constitué par :

* les peptides de groupe III selon la revendication 1 ou la revendication 2 et

* les peptides constitués par des fragments d'au moins 13 acides aminés qui sont inclus dans ou comprennent le fragment correspondant aux positions P76-94 de l'allergène majeur du venin d'abeille et qui se lie au moins aux molécules HLA-DR exprimées par les allèles DRB1*0701, DRB1*1101 et DRB1*1501 (molécules DR7, DR11 et DR2), avec une activité de liaison < 1000 nM et

- les peptides sélectionnés dans le **groupe D** constitué par :

30 * les peptides de groupe IV selon la revendication 1 ou la revendication 2 et

* les peptides constitués par des fragments d'au moins 13 acides

aminés qui sont inclus dans ou comprennent le fragment correspondant aux positions P122-134 de l'allergène majeur du venin d'abeille et qui se lient au moins aux molécules HLA-DR exprimées par les allèles DRB1*1101, DRB1*1301 et DRB1*1501 (molécules DR11, DR13 et DR2), avec une activité de liaison < 1000 nM.

- 5 8°) Compositions selon la revendication 6 ou la revendication 7, caractérisées en ce qu'elles comprennent en outre, le peptide correspondant aux positions P18-30 et/ou le peptide correspondant aux positions P45-62 et/ou le peptide correspondant aux positions P57-74 et/ou le peptide correspondant aux positions P65-82 et/ou le peptide correspondant aux positions P111-123, de l'allergène majeur du
10 venin d'abeille, conformément aux Tableaux ci-après :

| 101 | 401 | 1101 | 701 | 301 | 1301 | 1501 |
|---------|----------|----------|--------|--------|----------|----------|
| | | | P18-30 | | | |
| | | | P45-62 | | | |
| | | | | P57-74 | | |
| | | | | | | P65-82 |
| | | | | | | P76-88 |
| | | P77-94 | P77-94 | | | |
| | | | | | | P81-93 |
| P85-97 | P85-97 | P85-97 | P85-97 | P85-97 | P85-97 | |
| P94-106 | P94-106 | P94-106 | | | | |
| | P111-123 | | | | | |
| | | P122-134 | | | P122-134 | P122-134 |

| Allèles HLA-DR (2 ^{ème} gène) | | |
|--|---------|--------------------|
| B5*0101 | B4*0101 | B3*0101 |
| 21-38 | | |
| 45-62 | | |
| | | 53-70 |
| 77-94 | | 77-94 |
| | 81-93 | |
| 85-97 | | 85-97 ^a |
| | 89-101 | |
| 94-106 | | |
| 111-123 | 111-123 | 111-123 |
| 122-134 | 122-134 | 122-134 |

et/ou les peptides incluant les peptides précités.

9°) Compositions selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisées en ce que les peptides de groupe I peuvent avantageusement être concaténés pour former un seul peptide correspondant aux positions P81-97 de l'allergène majeur du venin d'abeille et/ou les peptides de groupe III peuvent avantageusement être concaténés pour former un seul peptide correspondant aux positions P76-94 de l'allergène majeur du venin d'abeille et/ou les peptides de groupe II et de groupe III peuvent avantageusement être concaténés, pour former un seul peptide correspondant aux positions P76-106 de l'allergène majeur du venin d'abeille.

10°) Compositions désensibilisantes pour les allergies au venin d'abeille, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une phospholipase A2 de venin d'abeille modifiée, dans laquelle les zones comprenant les peptides tels que définis aux revendications 1 à 9 sont conservées et les zones en dehors des zones précitées sont modifiées, de telle sorte qu'elles ne présentent plus de réactivité aux IgE et au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

11°) Utilisation d'une phospholipase A2 de venin d'abeille modifiée, dans laquelle les zones comprenant les peptides tels que définis aux revendications 1 à 9 sont conservées et les zones en dehors des zones précitées sont modifiées, de telle sorte qu'elles ne présentent plus de réactivité aux IgE, pour la préparation d'une composition désensibilisante pour les allergies au venin d'abeille.

1/8

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| I | I | Y | P | G | T | L | W | C | G |
| 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| H | G | N | K | S | S | G | P | N | E |
| 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| L | G | R | F | K | H | T | D | A | C |
| 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 |
| C | R | T | H | D | M | C | P | D | V |
| 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 |
| M | S | A | G | E | S | K | H | G | L |
| 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 |
| T | N | T | A | S | H | T | R | L | S |
| 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 |
| C | D | C | D | D | K | F | Y | D | C |
| 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 |
| L | K | N | S | A | D | T | I | S | S |
| 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 |
| Y | F | V | G | K | M | Y | F | N | L |
| 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 |
| I | D | T | K | C | Y | K | L | E | H |
| 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 |
| P | V | T | G | C | G | E | R | T | E |
| 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 |
| G | R | C | L | H | Y | T | V | D | K |
| 121 | 122 | 123 | 124 | 125 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 |
| S | K | P | K | V | Y | Q | W | F | D |
| 131 | 132 | 133 | 134 | | | | | | |
| L | R | K | Y | | | | | | |

FIGURE 1

2/8

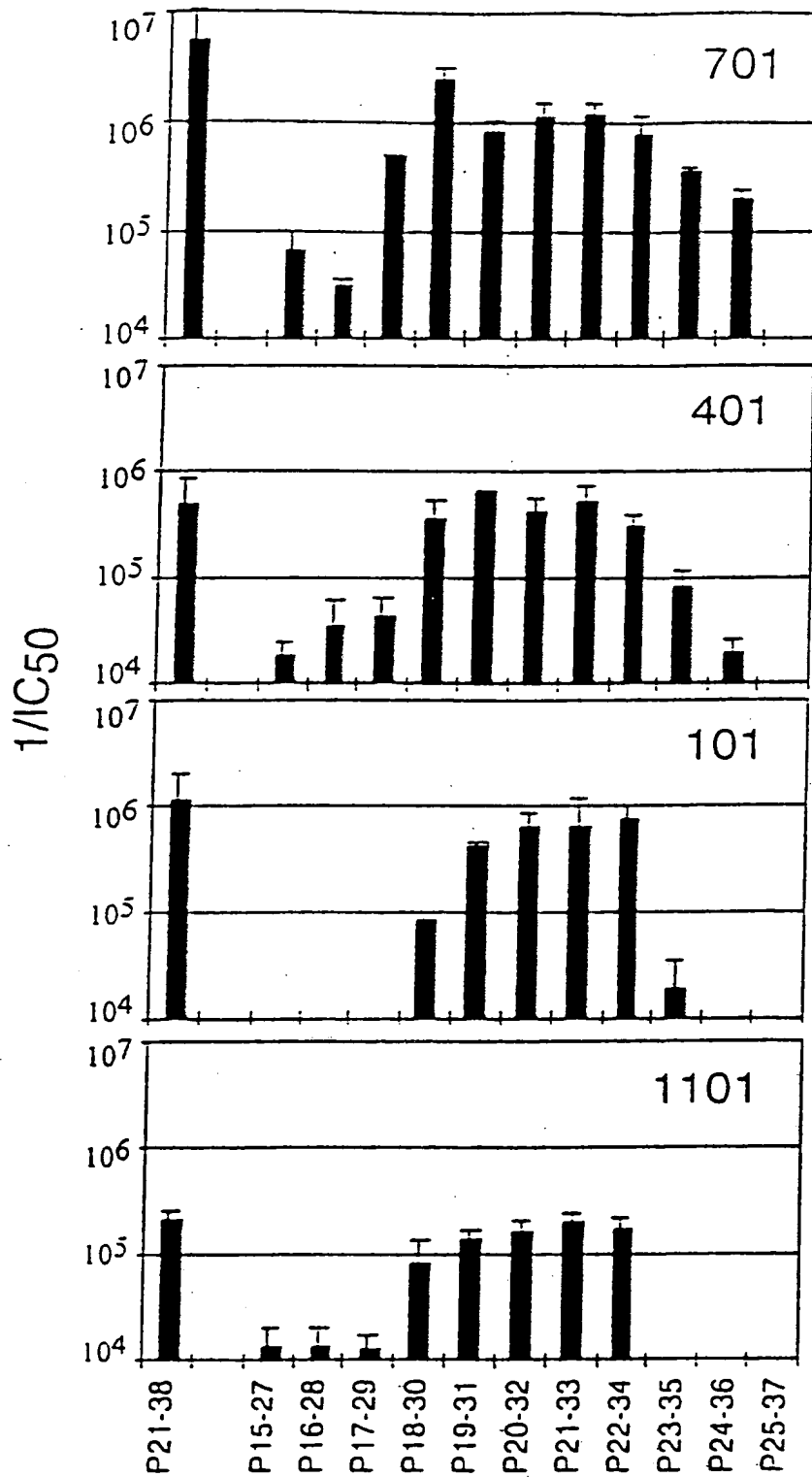


FIGURE 2

3/8

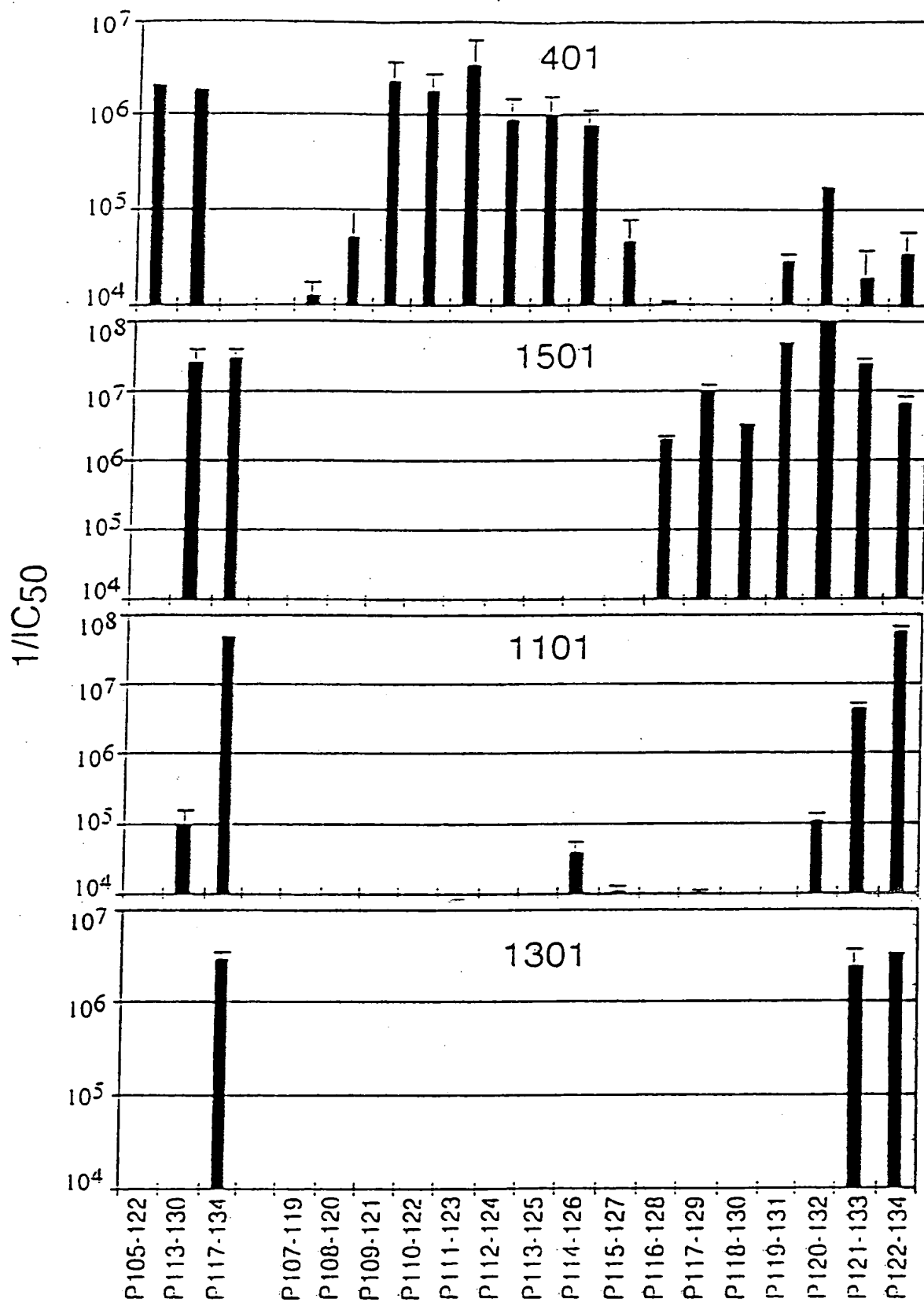


FIGURE 3

4/8

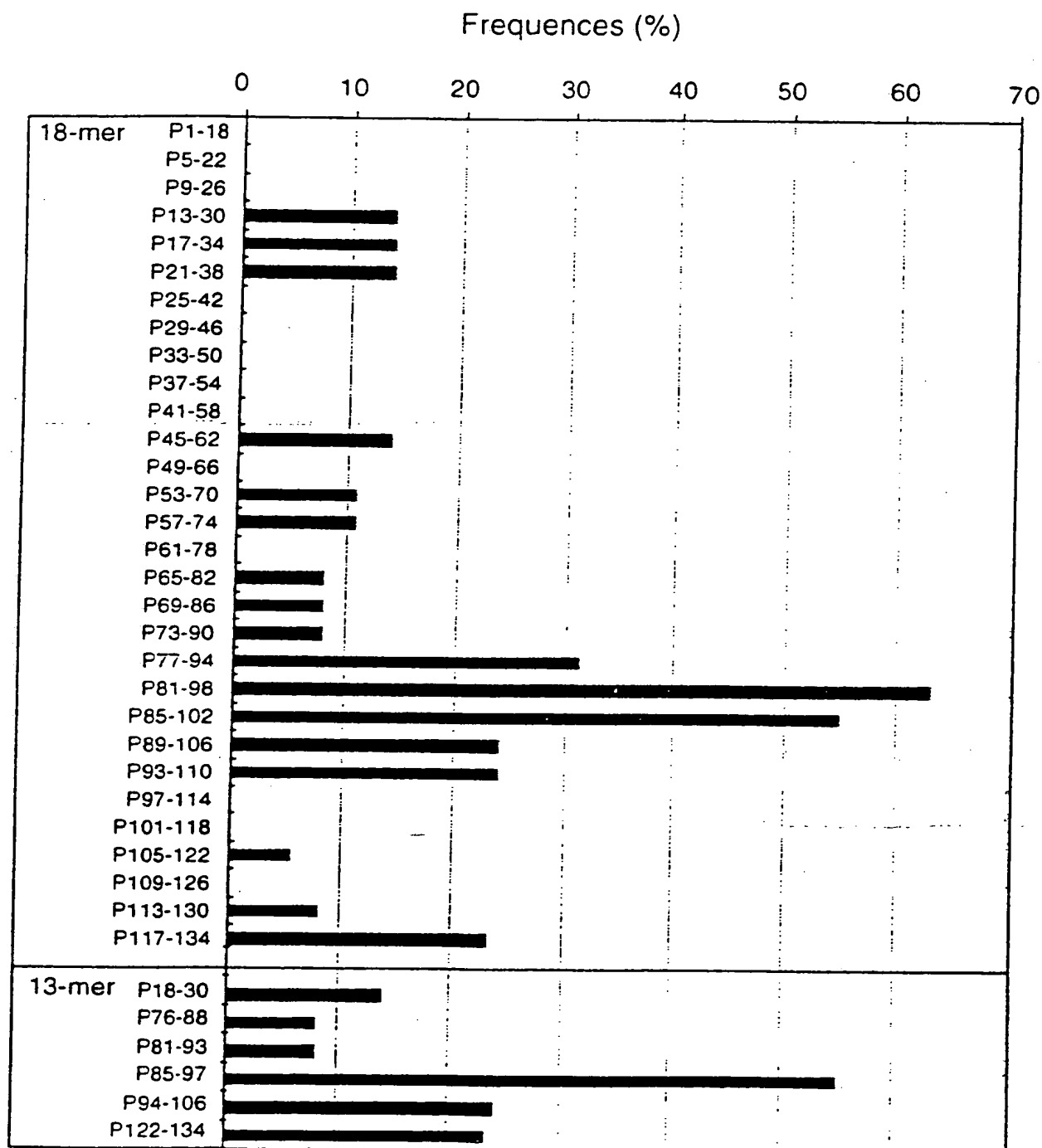
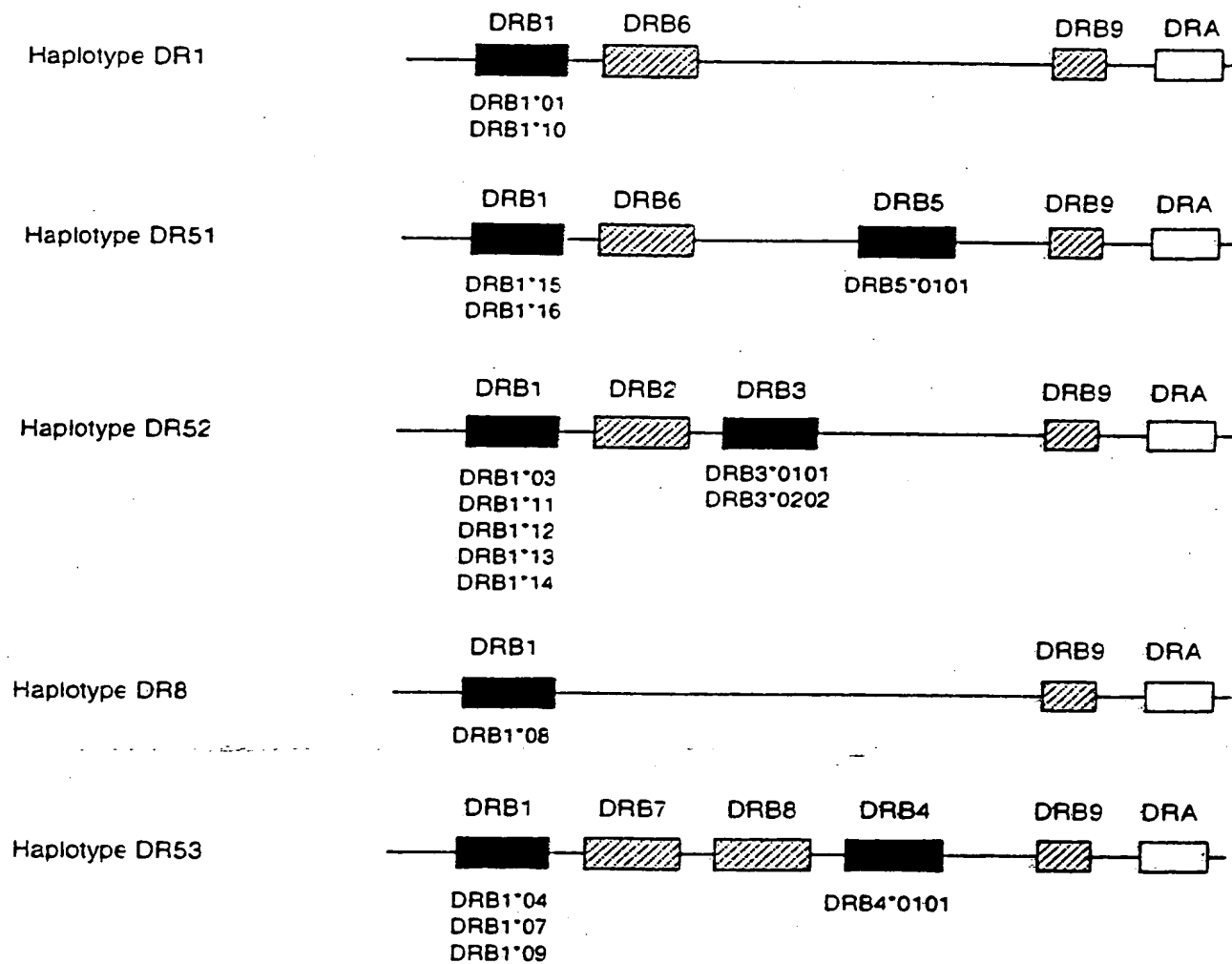


FIGURE 4

5 / 8

FIGURE 5

6/8

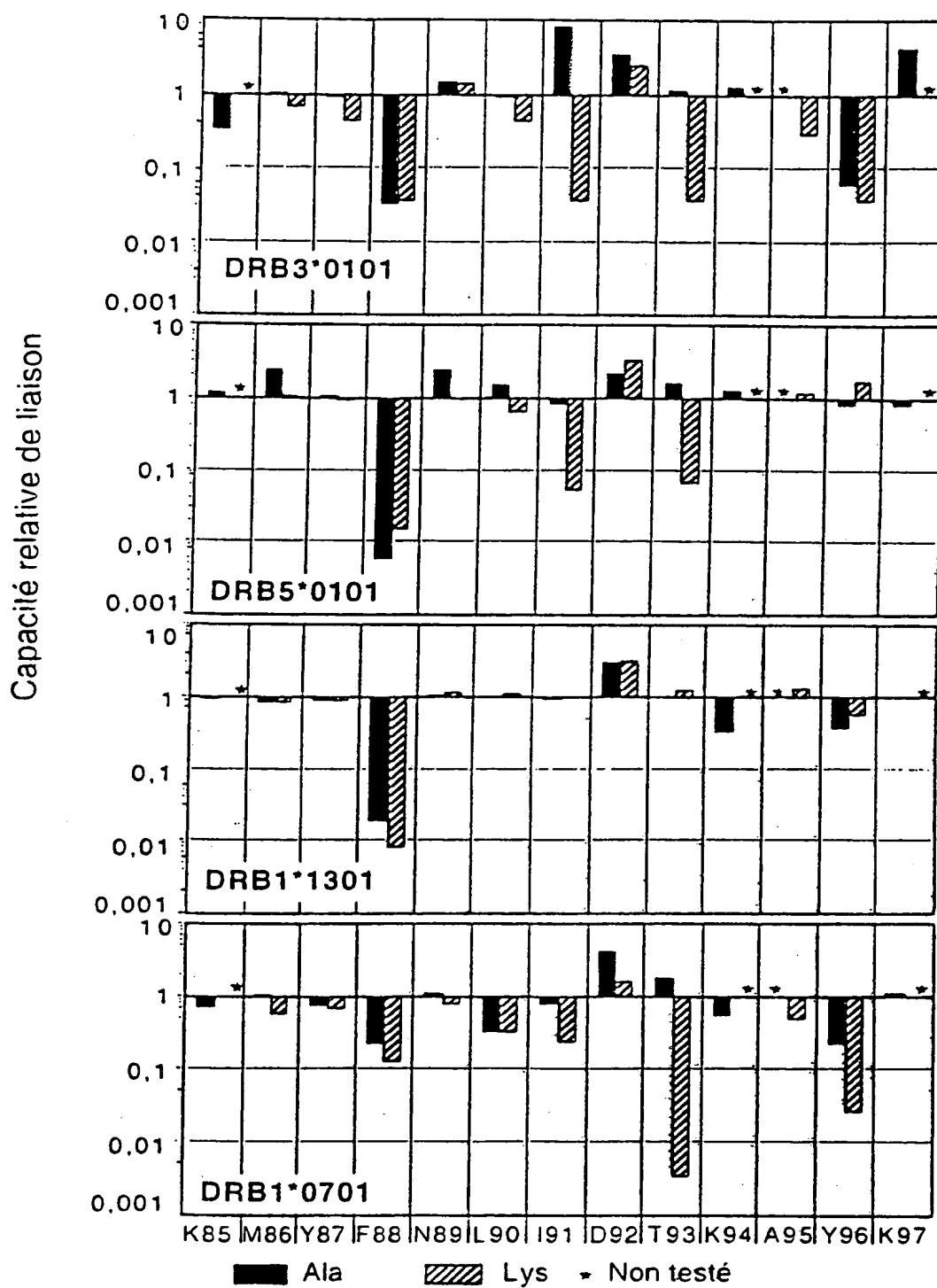


FIGURE 6

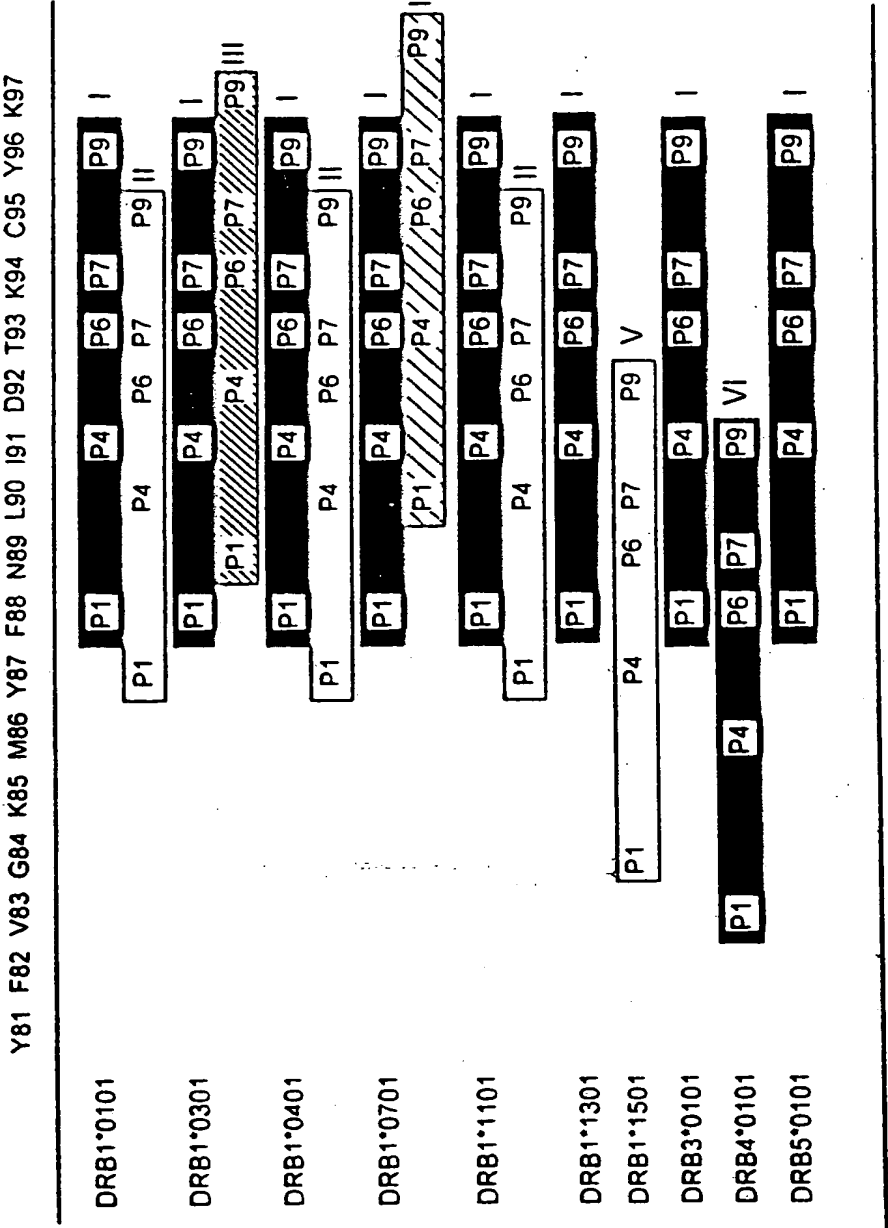


FIGURE 7

8/8

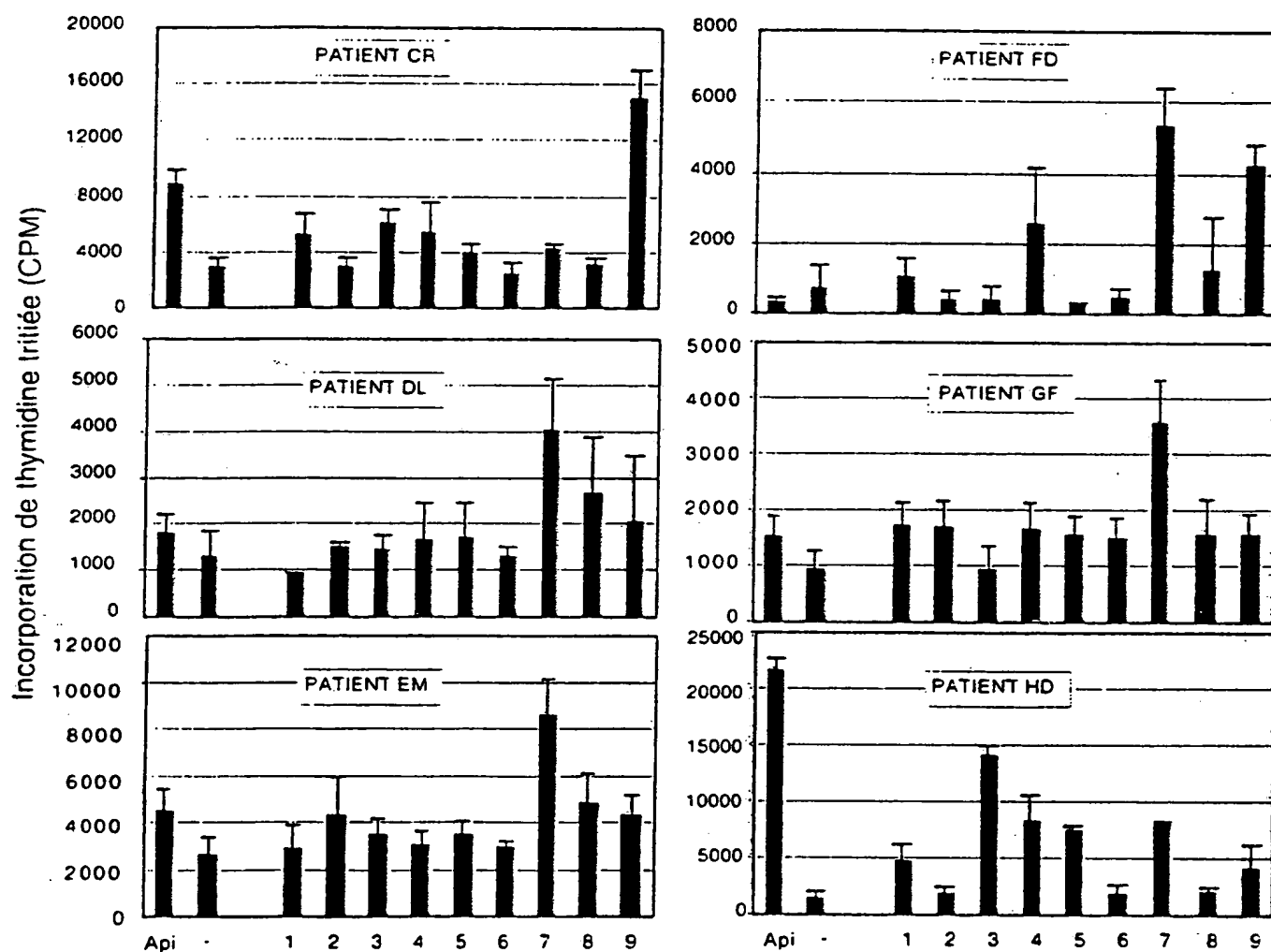


FIGURE 8

LISTE DE SEQUENCES

- <110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE (CEA)
MAILLERE, Bernard
POUELLE, Sandra
TEXIER, Catherine
MENEZ, André
- <120> PEPTIDES ET PROTEINES APTES A DESENSIBILISER LES SUJETS
ALLERGIQUES AU VENIN D'ABEILLE ET COMPOSITIONS LES
CONTENANT
- <130> BLOcp263/46F
- <140>
<141>
- <150> 9900879
<151> 1999-01-27
- <160> 7
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
<211> 13
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
- <220>
<223> Description de la séquence artificielle: Fragment
se liant aux allèles HLA-DR
- <400> 1
Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10
- <210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
- <220>
<223> Description de la séquence artificielle: Fragment
se liant aux allèles HLA-DR
- <400> 2
Glu Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Asp Gly Thr Gly Val Glu
1 5 10 15
- <210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Fragment
se liant aux allèles HLA-DR

<400> 3

Ala Lys Thr Ile Ala Tyr Asp Glu Glu Ala Arg Gly Leu Glu
1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Fragment
se liant aux allèles HLA-DR

<400> 4

Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Fragment
se liant aux allèles HLA-DR

<400> 5

Thr Glu Arg Val Arg Leu Val Thr Arg His Ile Tyr Asn Arg Glu Glu
1 5 10 15

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Fragment
se liant aux allèles HLA-DR

<400> 6

Glu Ser Trp Gly Ala Val Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu Thr
1 5 10 15Gly Pro Phe Thr
20

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Fragment
se liant aux allèles HLA-DR

<400> 7

Ala Gly Asp Leu Leu Ala Ile Glu Thr Asp Lys Ala Thr Ile
1 5 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/FR 00/00109

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N9/20 A61K38/46

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A | O'SULLIVAN, DEIRDRE ET AL: "Characterization of the specificity of peptide binding to four DR haplotypes" J. IMMUNOL. (1990), 145(6), 1799-808, 1990, XP002125340 page 1804, right-hand column, paragraph 4 -page 1808, left-hand column, paragraph 1; table VI | 1-10 |
| A | CARBALLIDO, JOSE M. ET AL: "T cell epitope specificity in human allergic and nonallergic subjects to bee venom phospholipase A2" J. IMMUNOL. (1993), 150(8, PT. 1), 3582-91, 1993, XP002125341 page 3587, right-hand column, paragraph 3 -page 3589, right-hand column, paragraph 1; figures 2,3 | 1-10 |
| -/- | | |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *B* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 May 2000

Date of mailing of the international search report

15/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. onal Application No

PCT/FR 00/00109

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A | M. DHILLON ET AL.: "Mapping human T cell epitopes on phospholipase A2: The major bee-venom allergen" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 90, no. 1, July 1992 (1992-07), pages 42-51, XP000857364 cited in the application page 48, left-hand column, paragraph 3 -page 50, left-hand column, last paragraph; figure 1 | 1-10 |
| A | U. MÜLLER ET AL.: "Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific t-cell anergy in patients allergic to bee venom" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 101, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 747-754, XP000857365 cited in the application page 748, right-hand column, paragraph 3 page 751, left-hand column, paragraph 4 -page 753, left-hand column, paragraph 2 | 1-10 |
| A | WO 94 04171 A (HARVARD COLLEGE) 3 March 1994 (1994-03-03) page 39; claims; examples | 1 |
| P,X | TEXIER, CATHERINE ET AL: "On the diversity and heterogeneity of H-2d-restricted determinants and T cell epitopes from the major bee venom allergen" INT. IMMUNOL. (1999), 11(8), 1313-1325, August 1999 (1999-08), XP000857282 figures 1,4-8; table 1 | 1-10 |
| P,X | FAITH, ALEXANDER ET AL: "An altered peptide ligand specifically inhibits Th2 cytokine synthesis by abrogating TCR signaling" J. IMMUNOL. (1999), 162(3), 1836-1842, 1 February 1999 (1999-02-01), XP002139163 page 1836, right-hand column, last paragraph -page 1837, left-hand column, paragraph 1 | 1-5 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00109

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9404171 A | 03-03-1994 | CA 2142007 A | 03-03-1994 |
| | | EP 0671926 A | 20-09-1995 |
| | | JP 8504177 T | 07-05-1996 |
| | | US 5827516 A | 27-10-1998 |
| | | US 5880103 A | 09-03-1999 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Doc. Internationale No

PCT/FR 00/00109

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N9/20 A61K38/46

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-------------|--|-------------------------------|
| A | O'SULLIVAN, DEIRDRE ET AL: "Characterization of the specificity of peptide binding to four DR haplotypes" J. IMMUNOL. (1990), 145(6), 1799-808, 1990, XP002125340 page 1804, colonne de droite, alinéa 4 -page 1808, colonne de gauche, alinéa 1; tableau VI | 1-10 |
| A | CARBALLIDO, JOSE M. ET AL: "T cell epitope specificity in human allergic and nonallergic subjects to bee venom phospholipase A2" J. IMMUNOL. (1993), 150(8, PT. 1), 3582-91, 1993, XP002125341 page 3587, colonne de droite, alinéa 3 -page 3589, colonne de droite, alinéa 1; figures 2,3 | 1-10 |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *I* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *S* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

30 mai 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15/06/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fuhr, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De: J Internationale No

PCT/FR 00/00109

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| A | M. DHILLON ET AL.: "Mapping human T cell epitopes on phospholipase A2: The major bee-venom allergen" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 90, no. 1, juillet 1992 (1992-07), pages 42-51, XP000857364 cité dans la demande page 48, colonne de gauche, alinéa 3 -page 50, colonne de gauche, dernier alinéa; figure 1 | 1-10 |
| A | U. MÜLLER ET AL.: "Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific t-cell anergy in patients allergic to bee venom" JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 101, no. 6, juin 1998 (1998-06), pages 747-754, XP000857365 cité dans la demande page 748, colonne de droite, alinéa 3 page 751, colonne de gauche, alinéa 4 -page 753, colonne de gauche, alinéa 2 | 1-10 |
| A | WO 94 04171 A (HARVARD COLLEGE) 3 mars 1994 (1994-03-03) page 39; revendications; exemples | 1 |
| P,X | TEXIER, CATHERINE ET AL: "On the diversity and heterogeneity of H-2d-restricted determinants and T cell epitopes from the major bee venom allergen" INT. IMMUNOL. (1999), 11(8), 1313-1325, août 1999 (1999-08), XP000857282 figures 1,4-8; tableau 1 | 1-10 |
| P,X | FAITH, ALEXANDER ET AL: "An altered peptide ligand specifically inhibits Th2 cytokine synthesis by abrogating TCR signaling" J. IMMUNOL. (1999), 162(3), 1836-1842 , 1 février 1999 (1999-02-01), XP002139163 page 1836, colonne de droite, dernier alinéa -page 1837, colonne de gauche, alinéa 1 | 1-5 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De. : Internationale No

PCT/FR 00/00109

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| WO 9404171 A | 03-03-1994 | CA 2142007 A | 03-03-1994 |
| | | EP 0671926 A | 20-09-1995 |
| | | JP 8504177 T | 07-05-1996 |
| | | US 5827516 A | 27-10-1998 |
| | | US 5880103 A | 09-03-1999 |
| <hr/> | | | |